



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไซยาโนแบคทีเรียกับแหนแดงเพื่อใช้ในการปรับปรุงประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในนาข้าวอินทรีย์
(Interaction Between the Cyanobionts and *Azolla* spp. for Improving the Effective of Nitrogen Fixation in Organic Rice Field)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไซยาโนแบคทีเรียกับแหนแดงเพื่อใช้ในการปรับปรุงประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในนาข้าวอินทรีย์
(Interaction Between the Cyanobionts and *Azolla* spp. for Improving the Effective of Nitrogen Fixation in Organic Rice Field)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โชคชัย วนฤ

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มีนาคม 2553

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในการทำวิจัย เพื่อเป็น
ทุนสนับสนุนค่าใช้จ่ายของนักศึกษาบัณฑิตศึกษาระดับปริญญาโท รวมถึงได้ให้การสนับสนุนด้าน
อุปกรณ์ เครื่องมือ บุคลากรและสถานที่ในการดำเนินการวิจัย กระผมขอขอบคุณ ศ. ดร. (เกียรติคุณ)
นันทกร บุญเกิด และ รศ. ดร. หนึ่ง เตียอำรุง ที่ได้ช่วยเหลือเป็นที่ปรึกษาและให้ข้อเสนอแนะที่มี
ประโยชน์อย่างยิ่ง

ผศ. ดร. โชคชัย วนภู

บทคัดย่อ

การจำแนกสายพันธุ์และการวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของແນແຂງในนาข้าว

การจำแนก/ การตรึงไนโตรเจน/ แนนแดง/ ข้าว

การจัดจำแนกสายพันธุ์ของແນແຂງมีมาอย่างยาวนานและค่อนข้างมีความซับซ้อน โดยส่วนมากจะเน้นการศึกษาลักษณะ โครงสร้างของสปอร์ซึ่งหาได้ยากในธรรมชาติ วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อจำแนกสายพันธุ์โดยศึกษาทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยคัดเลือกແນແຂງได้จากบ่อภายในฟาร์มและสวนเกษตรอินทรีย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทั้งหมด 3 สายพันธุ์ (AZO1 AZO2 และ AZO3) โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ในส่วนของสปอร์พิเศษ (megaspore) จะพบทุ่นลอย (float) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญที่ใช้ในการจำแนก ร่วมกับการศึกษาขนาดของใบและลักษณะของขนใบ (trichome) ผลของการจำแนกโดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าແນແຂງทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่ใน section *Azolla* AZO1 คือสายพันธุ์ *A. microphylla*, AZO2 คือสายพันธุ์ *A. cristata* และ AZO3 คือสายพันธุ์ *A. filiculoides* สำหรับการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากรากของແນແຂງเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอร่วมกับ 18S rDNA และ ITS region จากนั้นนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับเบส โดยนำมาเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสของແນແຂງใน GenBank พบว่าการใช้ 18S rDNA ให้ผลลำดับเบสของ AZO1 มีความใกล้เคียงกับ *Azolla* sp. Qiu 02051 99.2% AZO2 มีความใกล้เคียงกับ *A. filiculoides* 99.6% และ AZO3 มีความใกล้เคียงกับ *A. filiculoides* 99.4% ผลจากการใช้ 18S rDNA ไม่สามารถจำแนก AZO2 ในระดับสปีชีส์ได้ ดังนั้น จึงนำ ITS region มาใช้เพื่อให้ได้ผลการจำแนกที่จำเพาะเจาะจงขึ้น จากการใช้ ITS ให้ผลลำดับเบสของ AZO1 มีความใกล้เคียงกับ *A. microphylla* 99.3% AZO2 ใกล้เคียงกับ *A. mexicana* 99.0% และ AZO3 มีความใกล้เคียงกับ *A. filiculoides* 99.2% ดังนั้นการใช้วิธีวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยการใช้ ITS region เป็นวิธีที่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของແນແຂງได้อย่างชัดเจน สำหรับการใช้นาข้าวเพื่อเป็นปุ๋ยชีวภาพในนาข้าว เปรียบเทียบผลของการใช้ແນແຂງแต่ละสายพันธุ์กับการใช้ปุ๋ยเคมี (12-8-8 กก. N-P₂O₅-K₂O /ไร่) ผลผลิตของเมล็ดสูงที่สุดคือ 4.97 ตัน/เฮกเตอร์ ซึ่งพบในแปลงข้าวที่ปลูกร่วมกับการไถกลบແນແຂງสายพันธุ์ AZO1 (*A. microphylla*) พบว่าไม่มีความแตกต่างกับการใช้ปุ๋ยเคมี โดยผลผลิตที่ได้จากการใช้ແນແຂງสายพันธุ์นี้มีผลผลิตที่เพิ่มสูงขึ้นกว่าการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างมีนัยสำคัญ จากการทดลองนี้สรุปได้ว่าແນແຂງสายพันธุ์ *A. microphylla* เป็นແນແຂງสายพันธุ์ที่ดีที่สุดที่จะใช้เป็นปุ๋ยในนาข้าว โดยเพิ่มผลผลิตได้เทียบเท่ากับการใช้ปุ๋ยเคมี

ABSTRACT

FIXATION EFFICIENCY ANALYSIS OF *AZOLLA* SPECIES IN RICE FIELDS

CLASSIFICATION/ NITROGEN FIXATION/ *AZOLLA*/ RICE

The classification of *Azolla* (Azollaceae) has been quite complicated and continued for a long time. Because most taxonomies of *Azolla* (Azollaceae) focus primarily on reproductive structures which are rarely present in nature and unclear in some species, this study aimed to classify *Azolla* species by observing their morphology through stereo microscope, SEM and DNA analysis. Three isolated *Azolla* (AZO1, AZO2 and AZO3) were collected from the two ponds: one in the farm and the other in the organic garden, Suranaree University of Technology. The morphological study which was based on diameters of vegetative, epidermal trichomes and float number in megasporocarp found that the three species of *Azolla* were further classified as follows: AZO1 as *A. microphylla*, AZO2 as *A. cristata* and AZO3 as *A. filiculoides*. Moreover, DNA sequences (18S rDNA and ITS region) were investigated. The alignment sequencing (18S rDNA) indicated that AZO1 had 99.2% homology with *Azolla* sp. Qiu 02051, AZO2 had 99.6% homology with *A. filiculoides* and AZO3 had 99.4% homology with *A. filiculoides*. However, 18S rDNA could not be used to classify deep down to species level for AZO2, so the ITS region was used for more specific results. From the sequencing of ITS region, it was indicated that AZO1 had 99.3% homology with *A. microphylla*, AZO2 had 99.0% homology with *A. mexicana* and AZO3 had 99.2% homology with *A. filiculoides*. In addition, these results were in accordance with the morphological study, so the molecular method

using ITS region was needed. Furthermore, the application of *Azolla* species as biofertilizer in the rice field has been evaluated by comparing with the chemical fertilizer (12-8-8 kg / rai). The highest grain yield (4.97 t/ha) obtained from the rice field incorporated with AZO1 (*A. microphylla*), did not significantly differ from the chemical fertilizer. Nevertheless, the grain yield (16.72%) obtained from AZO1 was higher than that from chemical fertilizer (12.28%). Therefore, *A. microphylla* could be used as biofertilizer with the same result as chemical fertilizer.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ก
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
วัตถุประสงค์ของ โครงการวิจัย.....	10
ขอบเขตของ โครงการวิจัย.....	10
บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	12
2.1 สภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเห็ดนางฟ้า.....	12
2.2 การจำแนกโดยลักษณะทางสรีรวิทยา.....	13
2.3 การจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ.....	14
2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของการใช้เห็ดนางฟ้า.....	15
2.5 การวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของ เห็ดนางฟ้าแต่ละสายพันธุ์.....	16
2.6 การวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด.....	16
2.7 การวิเคราะห์ดิน.....	17
บทที่ 3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	18
3.1 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของเห็ดนางฟ้า.....	18
3.2 การจำแนกสายพันธุ์เห็ดนางฟ้าโดยการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ.....	29
3.3 ผลการวิเคราะห์ดิน.....	39
3.4 การใช้เห็ดนางฟ้าแต่ละสายพันธุ์เพื่อเป็นปุ๋ยชีวภาพในนาข้าว.....	40
3.5 การศึกษาการเจริญเติบโตของเห็ดนางฟ้า.....	42
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง.....	45
เอกสารอ้างอิง.....	46

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2.1	สายพันธุ์ແ່ນແດງທີ່คัดเลือกมาใช้ในการศึกษา.....	12
2.2	การเตรียม stock ของอาหารเหลว N-free medium	12
2.3	ไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้ในเทคนิค PCR และการหาลำดับเบส (sequencing).....	15
3.1	ผลวิเคราะห์ความใกล้เคียงกันของลำดับเบสในແ່ນແດງแต่ละสายพันธุ์โดยใช้ 18SrRNA และ Internal transcribe spacer of nuclear ribosomal RNA (rRNA).....	38
3.2	สรุปวิธีการจำแนกลำดับดีเอ็นเอของແ່ນແດງและวิธีการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของແ່ນແດງแต่ละสายพันธุ์.....	39
3.3	ผลการวิเคราะห์ดินในนาข้าวเมื่อใช้ແ່ນແດງและปุ๋ยเคมีต่อปริมาณอินทรีย์วัตถุใน ไตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียมในดินทั้งก่อนและหลังการใช้.....	39
3.4	ผลของการใช้ແ່ນແດງและปุ๋ยเคมีที่มีต่อการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105	40
3.5	ผลของการใช้ແ່ນແດງต่อผลผลิตข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105.....	41
3.6	น้ำหนักสด, น้ำหนักแห้ง, ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน อัตราการเจริญเติบโต และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของແ່ນແດງแต่ละสายพันธุ์ในนาข้าว.....	44

สารบัญรูปภาพ

รูป		หน้า
3.1	ลักษณะทางสรีรวิทยาของโครงสร้าง vegetative ภายใต้กล้อง stereo ที่กำลังขยาย 0.67 เท่า A) AZO1, B) AZO2 and C) AZO3.....	18
3.2	รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของขนใบ (epidermal trichomes) (A-B) รูปผิวใบและขนใบของ AZO1; (C-D) รูปผิวใบและขนใบของ AZO2; (E-F) รูปผิวใบและขนใบของ AZO3 T คือ ปลายหรือยอดของขนใบ (apical trichome cell) P คือ ก้านเซลล์ (pedicel cell) และ S คือ ปากใบ (stomata) รูป A, C และ E กำลังขยาย = x200 รูป B, D และ F กำลังขยาย = x800.....	20
3.3	ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้อง stereo ของเหานแดงสายพันธุ์ AZO1 ที่กำลังขยาย 4.5 เท่า (A) สปอร์เพศผู้และสปอร์เพศเมียที่จับคู่อยู่กับต้นเหานแดง (B) สปอร์เพศผู้ที่แยกออกมาจากต้น (C) สปอร์ขนาดเล็กที่อยู่ภายในสปอร์เพศผู้ (D) สปอร์เพศเมีย.....	21
3.4	ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้อง stereo ของเหานแดงสายพันธุ์ AZO2 ที่กำลังขยาย 4.5 เท่า (A) สปอร์เพศผู้และสปอร์เพศเมียที่จับคู่อยู่กับต้นเหานแดง (B) สปอร์เพศผู้ที่แยกออกมาจากต้น (C) สปอร์ขนาดเล็กที่อยู่ภายในสปอร์เพศผู้ (D) สปอร์เพศเมีย.....	22
3.5	ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้อง stereo ของเหานแดงสายพันธุ์ AZO3 ที่กำลังขยาย 4.5 เท่า (A) สปอร์เพศผู้ที่จับคู่อยู่กับต้นเหานแดง (B-C) สปอร์เพศผู้ที่แยกออกมาจากต้น (D) สปอร์ขนาดเล็กที่อยู่ภายในสปอร์เพศผู้.....	23
3.6	สปอร์เพศเมียของเหานแดงสายพันธุ์ AZO1 ที่แสดง perispore หรือ purine (P) ที่ห่อหุ้มสปอร์เพศเมีย โดยลักษณะทั่วไปของสปอร์เพศเมียที่พบคือ grindle (G) และ float (F) กำลังขยาย = 120 เท่า scale bar = 100 ไมโครเมตร.....	24
3.7	สปอร์เพศเมียของเหานแดงสายพันธุ์ AZO2 ที่แสดง perispore หรือ purine (P) ที่ห่อหุ้มสปอร์เพศเมีย โดยลักษณะทั่วไปของสปอร์เพศเมียที่พบคือ grindle (G) และ float (F) กำลังขยาย = 120 เท่า scale bar = 100 ไมโครเมตร.....	24

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูป	หน้า
3.8	รูปด้านข้างของสปอร์เพศผู้ที่เจริญเต็มที่ (A) สายพันธุ์ AZO1 (กำลังขยาย 100 เท่า) (B) สายพันธุ์ AZO2 (กำลังขยาย 85 เท่า) และ (C) สายพันธุ์ AZO3 (กำลังขยาย 100เท่า) scale bar = 100 ไมโครเมตร25
3.9	ภาพผ่าตามยาวของส่วนท้องใบแหนแดงแต่ละสายพันธุ์ที่เจริญเต็มที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ AZO1 (A) AZO2 (B) AZO3 (C) สำหรับสีเขียวแกมน้ำเงิน <i>Anabaena azollae</i> ยึดติดอยู่ในโพรงใบ c= โพรงใบ (cavity) ac = เซลล์สำหรับสีเขียวแกมน้ำเงิน (<i>Anabaena</i> cell) กำลังขยาย = 400 เท่า27
3.10	ภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่อยู่ร่วมกับแหนแดงสายพันธุ์ AZO1 AZO2 และ AZO3 ในรูป A B และ C ตามลำดับ V = เซลล์ทั่วไป (vegetative cell) H = เซลล์ที่ทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจน (heterocyst cell) ศึกษาที่กำลังขยาย 1000 เท่า.....28
3.11	แถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ของแหนแดงแต่ละสายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ NS เลน M= ดีเอ็นเอเครื่องหมาย (HyperLadder marker) เลน1 = แถบดีเอ็นเอสายพันธุ์ AZO3 เลน2 = แถบดีเอ็นเอสายพันธุ์ AZO1 และ เลน3 = แถบดีเอ็นเอสายพันธุ์ AZO2.....29
3.12	แถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ของแหนแดงแต่ละสายพันธุ์ A= สายพันธุ์ AZO1 B=สายพันธุ์ AZO3 C=สายพันธุ์ AZO2.....30
3.13	ลำดับเบสของสายพันธุ์ AZO1 ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank library โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).....31
3.14	ลำดับเบสของสายพันธุ์ AZO2 ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank library โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).....32
3.15	ลำดับเบสของสายพันธุ์ AZO3 ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank library โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).....33

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูป	หน้า
3.16	ลำดับเบสของสายพันธุ์ AZO1 ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank library โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)..... 34
3.17	ลำดับเบสของสายพันธุ์ AZO2 ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank library โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)..... 35
3.18	ลำดับเบสของสายพันธุ์ AZO3 ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank library โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)..... 36
3.19	ความสัมพันธ์ในระดับ โมเลกุล (phylogenic relationship) ของແຫນແຕງແຕ່ละสายพันธุ์..... 37
3.20	การเจริญเติบโตของແຫນແຕງสายพันธุ์ AZO1 (a), AZO2 (b) และ AZO3 (c) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร N-free medium โดยทำการเลี้ยงในสภาพให้แสงและอุณหภูมิในสภาพสิ่งแวดล้อมทั่วไป..... 43

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

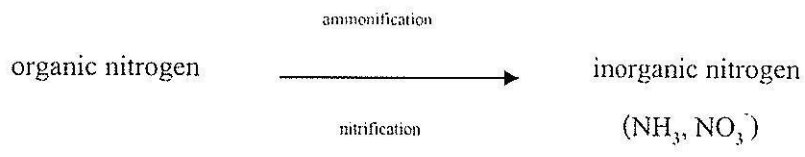
ประเทศไทยเป็นประเทศกสิกรรมที่มีการปลูกข้าวมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ บนพื้นที่ 57 ล้านไร่ ในปี พ.ศ. 2550 โดยให้ผลผลิตเฉลี่ย 433 กิโลกรัมต่อไร่ สามารถผลิตข้าวเปลือกได้ปีละประมาณ 23 ล้านตัน (ข้อมูลจากกรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์) คาดว่าในปี พ.ศ. 2552 ไทยจะสามารถส่งออกข้าวสารได้ประมาณ 8.6 ล้านตัน หรือมีมูลค่ากว่า 172,207 ล้านบาท (ข้อมูลจากสำนักงานเศรษฐกิจ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์) โดยประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ อาทิ จีน เวียดนาม อินเดีย ต่างประสบปัญหาด้านการเพาะปลูก จึงทำให้ไทยเป็นผู้ส่งออกข้าวอันดับหนึ่งของโลกและทำรายได้ให้กับประเทศเป็นจำนวนมากต่อเนื่องมาทุกปีจนถึงปัจจุบัน ปัจจัยหลักของการเพาะปลูกได้แก่ ความอุดมสมบูรณ์ของดิน น้ำ ปุ๋ย และยาปราบศัตรูพืช แต่ในปัจจุบันปุ๋ยและยาปราบศัตรูพืชมีราคาสูงมากขึ้น และการใช้สารเคมีในนาข้าวส่วนใหญ่ยังเป็นไปอย่างไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร ส่งผลให้ความอุดมสมบูรณ์และองค์ประกอบของดินต่ำลง ประสิทธิภาพการผลิตข้าวจึงต่ำลงตามไปด้วย

เกษตรอินทรีย์ คือ ระบบการผลิตที่คำนึงถึงสภาพแวดล้อม สมดุลย์ธรรมชาติ และความหลากหลายทางชีวภาพ โดยระบบการผลิต และการจัดการต้องคล้ายคลึงกับนิเวศวิทยาของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ และที่สำคัญที่สุด คือหลีกเลี่ยงการใช้สารสังเคราะห์ ได้แก่ ปุ๋ยเคมี สารเคมีปราบศัตรูพืช และฮอร์โมนต่าง ๆ ตลอดจนถึงมีชีวิตที่เกิดจากการดัดแปลงพันธุกรรม โดยเน้นการใช้อินทรีย์วัตถุ เช่น ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยพืชสด และปุ๋ยชีวภาพ ในการปรับปรุงดินให้มีความสมบูรณ์ ส่งผลให้ดินพืชมีความแข็งแรงสามารถต้านทานโรค และแมลงได้ด้วยตนเอง รวมถึงการนำเอาภูมิปัญญาท้องถิ่นมาใช้ประโยชน์ร่วมด้วย แต่จากรายงานขององค์การอาหาร และเกษตรแห่งสหประชาชาติ เมื่อปี พ.ศ. 2543 พบว่าประเทศไทยมีเนื้อที่ทำการเกษตรเป็นอันดับที่ 48 ของโลก แต่ใช้ยาฆ่าแมลงเป็นอันดับ 5 ของโลก ใช้ยาฆ่าหญ้า และฮอร์โมนเป็นอันดับ 4 ของโลก รวมทั้งนำเข้าสารเคมีสังเคราะห์ทางการเกษตร เป็นเงินกว่า 30,000 ล้านบาทต่อปี

ข้าวหรือพืชอื่นๆจะเจริญเติบโตสมบูรณ์ดีจำเป็นจะต้องได้รับธาตุอาหารพืชครบทั้ง 16 ธาตุ ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม กำมะถัน แมงกานีส เหล็ก สังกะสี ทองแดง โบรอน โมลิบดีนัม และคลอรีน แต่ที่เราต้องจัดหาให้มีเพียง 13 ธาตุ เพราะ คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน พืชได้จากธรรมชาติเอง จากกระบวนการสังเคราะห์แสง เกษตรกรส่วนใหญ่ยังไม่ทราบความจำเป็นของธาตุอาหารเหล่านี้

แต่จะทราบเพียงปุ๋ยที่ให้ธาตุไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) และโพแทสเซียม (K) เท่านั้น และในระบบเกษตรอินทรีย์จะไม่อนุญาตให้ใส่ปุ๋ยสังเคราะห์หรือปุ๋ยเคมีที่ให้ธาตุอาหารดังกล่าว

ธาตุไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่มีความสำคัญต่อพืชมากที่สุด เนื่องจากเป็นธาตุอาหารที่มีกสูญเสียได้ง่ายโดยธรรมชาติ ทั้งจากการกระทำของจุลินทรีย์บางชนิดในกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (denitrification) ทำให้ไนโตรเจนในดินแปรรูปและสูญเสียไปในสภาพก๊าซสู่บรรยากาศ โดยเฉพาะระบบการหมุนเวียนการใช้ธาตุไนโตรเจนในนาข้าวซึ่งมีน้ำขัง และออกซิเจนผ่านลงสู่ดินชั้นล่างได้น้อย จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการเพิ่มปริมาณธาตุไนโตรเจนให้แก่พืชนา ปุ๋ยในระบบเกษตรอินทรีย์ได้จากการใช้เศษวัสดุอินทรีย์ พืชตระกูลถั่วและเชื้อจุลินทรีย์ พืชยังไม่สามารถนำไนโตรเจนแบบอินทรีย์ (organic nitrogen) มาใช้ได้โดยตรง ต้องผ่านกระบวนการย่อยสลาย (decomposition) เพื่อแปรสภาพไนโตรเจนแบบอินทรีย์เหล่านี้ไปเป็นไนโตรเจนแบบอนินทรีย์ (inorganic nitrogen) ที่พืชสามารถนำไปใช้ได้เสียก่อน



ปัจจุบันมีการนำจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ nitrogenase มาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในนาข้าว ซึ่งสามารถจำแนกจุลินทรีย์เหล่านี้ได้เป็นสองกลุ่มตามลักษณะการดำรงชีพ ได้แก่ กลุ่มที่ดำรงชีพแบบอิสระ (free living nitrogen fixing microorganisms) และกลุ่มที่ต้องอาศัยร่วมกับพืช (symbiosis nitrogen fixing microorganisms) จากการนำไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) ทั้งกลุ่มที่ดำรงชีพแบบอิสระและกลุ่มที่ต้องอาศัยร่วมกับพืชมาปรับใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพในนาข้าว พบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับแหนแดง (*Azolla* sp.) นั้น มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงกว่ากลุ่มแรก จึงได้มีการนำแหนแดงมาทดลองใช้ในนาข้าวครั้งแรกในปี 2520 โดยกรมวิชาการเกษตร ซึ่งสรุปผลได้ว่าเมื่อเพาะเลี้ยงแหนแดงแล้วโลกลกก่อนปักดำ จะได้ผลผลิตข้าวใกล้เคียงหรือสูงกว่าการใช้ปุ๋ยเคมีในอัตรา 6 กก. N/ไร่ นอกจากนี้ยังมีการเลี้ยงแหนแดงในระยะปักดำซึ่งได้ผลผลิตข้าวทัดเทียมกับการเลี้ยงแหนแดงแล้วโลกลกก่อนปักดำ และเมื่อทดลองเลี้ยงแหนแดงหลังปักดำประมาณ 3 สัปดาห์ ก็ยังได้ผลผลิตข้าวเท่าเทียมกับการเลี้ยงแหนแดงในช่วงปักดำ (ประเสริฐ, 2543)

การนำแหนแดงซึ่งมีไซยาโนแบคทีเรียอาศัยอยู่ร่วมด้วยจึงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในนาข้าวได้ดีเท่ากับการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนจากยูเรีย แหนแดงจึงเป็นพืชที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ประโยชน์ในนาข้าว อีกทั้งยังมีลักษณะการเจริญเติบโตทอดขนานกับผิวน้ำ ปกคลุมพื้นที่น้ำขังได้ในระยะเวลาสั้น มีอัตราส่วน C:N ในระดับ 8-13 เท่าทำให้แหนแดงมีวง

ชีพต้นและสลายตัวน้ำเปื่อยได้ไว ในกรณีที่ไ้จากการตรึงก๊าซไนโตรเจนจึงถูกปลดปล่อยออกมาให้คืนข้าวคูดซับไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรง

แห่นแดง (*Azolla* sp.) เป็นเฟิร์นน้ำ (true ferns) เป็นกลุ่มเฟิร์นที่มีขนาดเล็ก ลอยอยู่ที่ผิวน้ำ รูปร่างเหมือนกับเฟิร์นทั่วๆ ไป ซึ่งมีอยู่ 2 สกุลคือ *Salvinia* (จอกหูหนู) *Azolla* (แห่นแดง) ใบขนาดเล็กมาก ไม่มีการม้วนตัวของใบอ่อน (crozier, monkey tail, fiddle head) แต่ละ sporocarp จะมีเพียงเมกะสปอร์ (megaspore) หรือ ไมโครสปอร์ (microspore) โดยที่แต่ละ sporocarp จะสร้างเพียง 1 กลุ่มอับสปอร์ (sorus) ส่วนหนึ่งของ sporocarp เปลี่ยนแปลงมาจากอินดูเซียม (indusium)

แห่นแดงพบกระจายอยู่ทั่วไป ยกเว้นบริเวณที่มีสภาพเป็นน้ำแข็งตลอดปี ส่วนใหญ่พบในเขตอบอุ่น มักพบ *A. pinnata* และ *A. nilotica* ในเขตร้อนแถบเอเชียและแอฟริกาได้ สำหรับประเทศไทยพบทั่วไปทุกภาค โดยปกติมักเจริญเติบโตในแหล่งน้ำนิ่ง เช่น ในหนองน้ำ คลอง คู ตลอดจนนาข้าว แหล่งน้ำใดที่มีกระแสน้ำไหลมีคลื่นและลมมักไม่พบแห่นแดงเนื่องจากกระแสน้ำ คลื่นและลมเป็นอุปสรรคต่อการเจริญเติบโต

แห่นแดงมีชื่อสามัญว่า azolla, water fern, mosquito fern และ water velvet ชื่อสกุลของแห่นแดงมาจากภาษากรีก 2 คำคือ *azo* + *olloyo* หมายถึง killed by dryness ปัจจุบันพบแห่นแดงกระจายอยู่ 7 ชนิดและพบเป็นซากโบราณ 48 ชนิด ในประเทศไทยพบเพียงชนิดเดียว คือ *A. pinnata* แห่นแดงขนาดเล็กที่สุดมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2.5 ซม เช่น *A. pinnata* ส่วนขนาดใหญ่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 15 ซม เช่น *A. nilotica* เฟิร์นน้ำอื่นๆ ที่จัดอยู่ในอันดับเดียวกับแห่นแดง ได้แก่สกุล *Lemna*, *Pistia*, *Salvinia*, *Trapa* และ *Wolffia* และไม้น้ำที่มีรากยึดดิน ได้แก่ *Ceratophyllum*, *Ludwigia*, *Neptunia* และ *Polygonum*

หากจัดลำดับตามลักษณะทางอนุกรมวิธาน สามารถจำแนกแห่นแดงได้ ดังนี้

Division Pteridophyta

Subdivision Filicopsida

Order Salviniiales

Family Azollaceae

Genus *Azolla*

Subgenera	<i>Azolla</i>		<i>Tetrasporocarpia</i>
Sections	<i>Azolla</i>	<i>Rhizosperma</i> (Meg.) Strasb.	
Species	<i>A. caroliniana</i> Willd. <i>A. filiculoides</i> Lam. <i>A. mexicana</i> Presl	<i>A. pinnata</i> R.Br.	<i>A. nilotica</i> Decne.ex Mett.

	<i>A. microphylla</i> Kaulf <i>A. ruba</i> R.Br.		
Subspecies		<i>A. pinnata</i> subsp. <i>africana</i> (Desv.) R.M.K. Saunder and K. Fowler <i>A. pinnata</i> subsp. <i>asiatica</i> (Desv.) R.M.K. Saunder and K. Fowler <i>A. pinnata</i> subsp. <i>pinnata</i>	

แหนแดงสามารถจัดแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มตามจำนวนทุ่นลอย (floats) ใน megasporocarp และรูปร่างของ glochidia โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. *Azolla* ประกอบด้วย 5 species มีทุ่นลอย 3 ลูกและ glochidia รูปร่างเป็นลูกศร (arrow-shaped glochidia) ได้แก่ *A. caroliniana*, *A. filiculoides*, *A. mexicana*, *A. microphylla* และ *A. ruba*
2. *Rhizosperma* (Meg.) Strasb. ประกอบด้วยทุ่นลอย 9 ลูกและไม่มี glochidia เดิมมี 2 species คือ *A. pinnata* R.Br. และ *A. nilotica* Decne.ex Mett. ซึ่ง *A. pinnata* R.Br. ยังแบ่งออกเป็น 3 subspecies คือ *A. pinnata* subsp. *asiatica* (Desv.), R.M.K. Saunder และ K.Fowler และเนื่องจาก *A. nilotica* Decne.ex Mett. มี sporocarps (heterosporocarp) อยู่เป็นกลุ่มที่มี 4 sporocaps ปัจจุบันจึงมีการจำแนก *A. nilotica* Decne.ex Mett. ออกจาก section *Azolla* และจัดให้เป็น subgenus ใหม่คือ *Tetrasporocarpia* (Carrapico, Teixeira and Diniz, 2002)

แหนแดงมีความสำคัญในทางเกษตรกรรม เนื่องจากมีไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) ชนิด *Anabaena azollae* ที่อาศัยอยู่ร่วมกับแหนแดงแบบพึ่งพาอาศัย (mutualism) สามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ (nitrogen fixation) ได้ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการนำมาใช้เป็นปุ๋ยในนาข้าว นอกจากนี้ ยังมีการใช้แหนแดงในการเลี้ยงสัตว์ โดยการผสมลงในอาหารไก่ นก เป็ดและปลา เป็นต้น

แหนแดงเป็นพืชที่ลอยตัวอยู่ตามผิวน้ำ ส่วนใหญ่มีทุ่นลอยเป็นแพ แผ่นเป็นแผ่นคลุมผิวน้ำ มีลำต้น รากและใบที่แท้จริง มีโครงสร้างเป็นแบบง่าย ๆ ไม่ซับซ้อน มีท่อลำเลียงน้ำ (xylem) และท่อลำเลียงอาหาร (phloem) ลำต้นสามารถแตกกิ่งทอดขนานไปกับผิวน้ำ เรียกว่าไรโซมหรือเหง้า

(rhizome) โดยที่ส่วนปลายของไรโซมสามารถทำให้เกิดต้นใหม่ได้ ไรโซมของแหวนแดงมีลักษณะ โส่สั้น และเปราะ หักง่าย บนกิ่งมีใบขนาดเล็กเรียกว่าฟรอนด์ (frond) เป็นใบประกอบแบบขนนก (pinnately compound leaf) คือประกอบด้วยใบย่อยหลายๆ ใบแตกออกสองข้างของแกนกลาง โดยใบย่อยชุดแรกที่แตกออกมาเรียกว่า pinna เป็นใบย่อยที่เกิดอยู่บนก้านใบที่เรียกว่า rachis ใบย่อยมีขนาดเล็ก แบน บาง ไม่มีก้านใบ (sessile) เรียงตัวซ้อนกันแบบสลับ (alternate) บนกิ่ง แต่ละใบย่อยประกอบด้วย 2 พู ขนาดเกือบเท่ากัน พูล่าง (ventral lobe) มีขนาดใหญ่กว่าพูนบน (dorsal lobe) เล็กน้อย พูล่างจมอยู่ใต้ผิวน้ำ ไม่มีสี โปร่งแสง มีลักษณะเป็นเยื่อบางๆ เป็นเซลล์ชั้นเดียว ส่วนใหญ่ทำหน้าที่ช่วยในการลอยตัว ส่วนพูนบนมีลักษณะหนา มักลอยตัวอยู่เหนือผิวน้ำ มีสีเขียว ทำหน้าที่สร้างอาหารจากการสังเคราะห์แสง (photosynthesis)

การเจริญเติบโตในระยะแรกของพูนบน พบว่าผิวด้านบนใกล้โคนใบจะมีช่องว่าง (cavity) ที่มีช่องเปิดขนาดใหญ่เกิดขึ้นมา ซึ่งช่องเปิดนี้เป็นทางให้ไซยาโนแบคทีเรียผ่านเข้าไปอาศัยอยู่และเจริญเติบโตภายในช่องว่างนี้ ขณะที่ใบของแหวนแดงเจริญเต็มที่ เซลล์ผิวใบด้านบนบริเวณใกล้ช่องว่างจะแบ่งตัวเจริญไปเชื่อมกัน ซึ่งในช่องใบอาจมีไซยาโนแบคทีเรียอยู่ถึง 50,000-80,000 เซลล์ต่อ 1 ช่อง (Khan, 1987) ด้านล่างของกิ่งคือรากซึ่งแตกแขนงจากลำต้นโดยตรง จึงจัดเป็นรากวิสามัญ (adventitious root) รากเหล่านี้มีขนาดเล็กเป็นฝอยละเอียดและไม่แตกแขนง รากที่มีอายุน้อยจะมีหมวกราก เมื่อรากเจริญเต็มที่หมวกรากจะหลุดไปและมีขนรากมาแทนที่ซึ่งเป็นลักษณะที่ต่างจากพืชน้ำโดยทั่วไป รากของแหวนแดงทำหน้าที่คล้ายกับรากพืชทั่วไปคือดูดน้ำและเกลือแร่

แหวนแดงสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยการหักเป็นท่อน (fragmentation) ของไรโซม แต่ละท่อนที่หักจะเจริญแตกกิ่งก้านสาขามากมาย แหวนแดงบางชนิดที่มีการสืบพันธุ์แบบนี้ ทำให้มีน้ำหนักรวมเพิ่มขึ้น 3-5 เท่า ภายใน 7 วัน นอกจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการหักเป็นท่อนแล้ว ยังสามารถสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศได้อีกวิธีการหนึ่งคือการสร้างสปอร์ ซึ่งสร้างอยู่ภายใน (female gametophyte, mega-gametophyte) การเกิด sporocarp ในธรรมชาติส่วนใหญ่มักพบในฤดูร้อน ที่มีความเข้มของแสงมากในช่วงกลางวัน และในช่วงกลางคืนมีอุณหภูมิค่อนข้างต่ำ แหวนแดงยังมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างไข่บนต้นแกมีโทไฟต์เพศเมีย (female gametophyte, megagametophyte) และสร้างสเปิร์มบนต้นแกมีโทไฟต์เพศผู้ (male gametophyte, microgametophyte)

Sporocarp มีรูปร่างกลม ผันบาง สร้างเป็นคู่อยู่ที่พูล่างของใบแรก อยู่ทางด้านหลังใบ (abaxial) ของกิ่ง แต่ละ sporocarp มีเพียง 1 อับสปอร์ (sorus) อับสปอร์ของแหวนแดงมีรูปร่างกลม (circular) และมีเยื่อบางๆ ที่เจริญออกมาจากใบ เรียกว่าอินดูเซียม (indusiate sorus) ครอบคลุมอยู่ เมื่อ sporocarp เจริญเต็มที่ อินดูเซียมจะเปลี่ยนแปลงโดยแข็งตัวขึ้นกลายเป็นผนังของ sporocarp ขณะที่ sporocarp ยังเจริญไม่เต็มที่ ภายใน sporocarp จะสร้างเมกะสปอร์เรเนเจียม (megasporangium) 1

อันและไมโครสปอเรนเจียม (microsporangium) หลายอันอยู่ที่บริเวณฐานของซอรัส (receptacle) ต่อมาอับสปอร์เพียงอันเดียวเท่านั้นที่จะเจริญต่อไป ส่วนอับสปอร์ที่ไม่เจริญจะฝ่อไป ดังนั้น sporocarp ที่ภายในมีเฉพาะเมกะสปอเรนเจียม จึงเรียกว่า megasporocarp หรือ macrosporocarp ซึ่งจะมีขนาดเล็กกว่าไมโครสปอเรนเจียม และภายในมีเพียง 1 เมกะสปอเรนเจียมเท่านั้น เช่น กรณีที่ megasporocarp ฝ่อ microsporocarp จะเจริญแทนที่ ซึ่งภายใน 1 microsporocarp อาจมีจำนวนมากกว่า 120 ไมโครสปอเรนเจียม และเกาะอยู่ที่ฐานของซอรัส รวมกันเป็น 1 ซอรัส แต่ละไมโครสปอเรนเจียมอาจเจริญอย่างไม่พร้อมกัน ทำให้การเจริญของไมโครสปอร์ระยะต่างๆ ภายในแมสซูรี (massulae) แตกต่างกัน

Microsporocarp ประกอบด้วยอับสปอร์หรือไมโครสปอเรนเจียมประมาณ 7-10 อัน และมีอินดูเซียมคลุมอยู่ด้านนอก แต่ละไมโครสปอเรนเจียมมีไมโครสปอร์ (microspore) ประมาณ 32-64 สปอร์ แต่ละไมโครสปอเรนเจียมจะมีแมสซูรี 3-10 อัน แมสซูรีเหล่านี้เกิดจากการแข็งตัวของไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ภายในแมสซูรีจะมีไมโครสปอร์ บริเวณผิวของแมสซูรีจะมีขนที่เรียกว่า glochidia ซึ่งปลายสุดมีลักษณะเป็นตะขอ ทำหน้าที่เพื่อการเกาะติดกับ labyrinthine filaments บนชั้น exoperine ของเมกะสปอร์

Megasporocarp มีขนาดเล็กกว่า microsporocarp มาก ประกอบด้วยเมกะสปอเรนเจียมหนึ่งอันและภายในเมกะสปอเรนเจียมมีเพียง 1 เมกะสปอร์ ผิวด้านนอกสุดของ megasporocarp คืออินดูเซียม ถัดเข้ามาคือ perispore (perine) ซึ่งประกอบด้วย 3 ชั้น ได้แก่ ชั้น exoperine เป็นชั้นนอกสุดของ perispore ที่มีช่องเล็กๆ อยู่โดยรอบและมี labyrinthine filaments ซึ่งเป็นเส้นสายให้ glochidia มาเกาะ ชั้น mesoperine และชั้น endoperine บริเวณปลายด้านเปิดของอินดูเซียมมี cap ติดอยู่ และ cap จะถูกเชื่อมเข้ากับ floats (ทำหน้าที่เป็นทุ่นลอย) และ perispore ด้วย gula (columella)

เมื่อ microsporocarp และ megasporocarp เจริญเติบโตเต็มที่แตกและจมสู่ที่องน้ำ เมกะสปอร์จะงอกและเจริญเติบโตไปเป็นต้นตัวเมีย เรียกว่า เมกะแกมิโทไฟต์ (megagametophyte) หรือ โปรทาลีสตัวเมีย (female prothallus) แต่ละโปรทาลีสจะสร้างอาร์คีโกเนียม (archegonium) หนึ่งอันหรือมากกว่า ภายในอาร์คีโกเนียมมีเซลล์ไข่ (egg cell) ขณะที่ไมโครสปอร์ (microspore) งอกจะปล่อยสเปิร์ม (spermatozoid, antherozoid) ออกจากแมสซูรีผ่านเข้า cap, floats, 3 neck cells, neck canal cell และ ventral canal cell เข้าไปผสมกับเซลล์ไข่ (egg cell, ovum) หลังจากเกิดการปฏิสนธิ (fertilization) เป็นไซโกต (zygote) ไซโกตแบ่งตัวแบบไมโทซิส (mitosis division) หลายครั้งจนกระทั่งได้เอมบริโอ (embryo)

เอมบริโอเริ่มจากไซโกตยึดยาวแล้วแบ่งตัวตามขวางหรือแบ่งตัวในแนวเฉียง (obligate division) ต่อมาแบ่งในแนวตั้งฉากกับการแบ่งครั้งแรก (anticlinal division) ได้เอมบริโอ 4 เซลล์ (proembryo) ซึ่งแต่ละเซลล์จะเป็นเซลล์เริ่มต้นที่จะเจริญเป็นอวัยวะต่างๆ ของต้นอ่อน (young

sporophyte) คือ ใบ (เกิดจาก epibasal cells ของ proembryo) ลำต้น ราก (เกิดจาก hypobasal cells ของ proembryo) และฟุต (foot) โดยเซลล์ที่อยู่ด้านนอกใกล้กับส่วนคอ (neck) ของอาร์คี โกเนียมจะเจริญไปเป็นใบและลำต้น ส่วนสองเซลล์ที่อยู่ด้านในจะเจริญไปเป็นรากและฟุต

วัฏจักรชีวิตของແຫນແດງจะมีความสัมพันธ์กับ *Anabaena* ทั้งในระยະแกมีโทไฟต์ (gametophyte generation) และระยະสปอโรไฟต์ (sporophyte generation) ซึ่งมีระยะเวลาของการดำรงชีพนานกว่าระยະแกมีโทไฟต์ แต่ถ้าเป็นระยະแกมีโทไฟต์จะพบว่ามีสัมพันธ์กันเฉพาะในเมกะสปอเรนเจียมเท่านั้น โดยอะไคเนต (akinet) จะฝังตัวอยู่ในอินดูเซียม และหลังจากเกิดการปฏิสนธิระหว่างไข่และสเปิร์มแล้วจะเจริญต่อจนกระทั่งเป็นสปอโรไฟต์ใหม่ และจะมีความสัมพันธ์กับ *Anabaena* ต่อไปอีก (Carrapico, 2002)

ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) ในແຫນແດງ

ไซยาโนแบคทีเรีย จัดอยู่ใน Division Cyanophyta มีรูปร่างและการเรียงตัวแตกต่างกันมาก อาจเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นสาย (filament) ในพวกที่เป็นเซลล์เดี่ยวมักไม่เคลื่อนที่ ต่างจากพวกที่เป็นสายมักเคลื่อนที่แบบคลีปคลาน (gliding) และไม่มีฟลาเจลลา (flagella) *Anabaena azollae* อยู่ในวงศ์ Nostocaceae มีลักษณะเป็นสาย ภายในสายมีเซลล์ 3 ชนิด ได้แก่

1. akinete เป็นเซลล์ที่มีผนังเซลล์หนา ถูกสร้างขึ้นในสภาวะแห้งแล้งเพื่อปรับตัวให้ดำรงชีวิตอยู่ได้
2. vegetative cell เป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์แสง เนื่องจากภายในมี carboxysome และยังมีความสำคัญในการแบ่งตัวของเซลล์
3. heterocyst มักพบระหว่าง vegetative cells (intercalary heterocyst) หากเกิดที่ปลายสาย เรียกว่า terminal heterocyst ลักษณะเป็นเซลล์ผนังหนา มีเอนไซม์ nitrogenase อยู่ในภายใน ทำให้สามารถตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) จากบรรยากาศได้ เอนไซม์ nitrogenase มีความไวต่อก๊าซออกซิเจน ดังนั้นการทำงานของเอนไซม์นี้จะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อสภาวะใน heterocyst ต้องไร้ออกซิเจน (anaerobe)

เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตประเภท โปรคาริโอต จึงมีโครงสร้างต่างจากยูคาริโอต (eukareote) ดังนี้

- ไม่มีเยื่อหุ้มล้อมรอบสารพันธุกรรม เรียกบริเวณนี้ว่า nucleoid
- มีไรโบโซมขนาด 70s
- จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (negative gram) มีสาร peptidoglycan น้อย แต่มีไขมันมาก จึงติดสีจางเมื่อย้อมด้วยสี crystal violet

- มี gelatinous layer (sheath) หุ้มด้านนอกของผนังเซลล์ และที่ผนังเซลล์มี N-acetylglucosamine (NAG) และ N-aetylmuramic acid (NAM) ซึ่ง NAM เชื่อมกันได้ด้วย peptidoglycan (mucopeptide) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกมี lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งประกอบด้วย lipid A, core polysaccharide และ O antigen
- มี cytoplasmic membrane ทำหน้าที่ควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร
- ใน cytoplasm มีลักษณะของเยื่อหุ้มที่เรียงเป็นชั้น เรียกว่า photosynthetic lamellae
- Cytoplasmic inclusions เป็นสารที่สะสมในเซลล์ เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตขึ้นเรื่อยๆ สารเหล่านี้มีทั้งประเภทที่ละลายและไม่ละลายน้ำ ในไซยาโนแบคทีเรีย สารเหล่านี้จะอยู่ภายในถุงเยื่อหุ้มอีกชั้นหนึ่ง ได้แก่ cyanosome ภายในมีเอนไซม์สำหรับตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสง พบ cyanosome ใน vegetative cells ถุงเยื่อหุ้มอีกชนิดหนึ่งคือ gas vacuole ภายในประกอบด้วย vesicle เรียงตัวเป็นระเบียบ gas vacuole สามารถทนต่อแรงกดดันภายในเซลล์ได้และยอมให้ก๊าซผ่านเยื่อหุ้ม ทำหน้าที่ช่วยให้เซลล์ลอยตัว
- เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต อาหารจะถูกนำเข้าสู่เซลล์และเอนไซม์ภายในเซลล์จะเปลี่ยนแปลงอาหารเหล่านี้เป็นสารประกอบของเซลล์ ทำให้เซลล์ยืดยาวออกและมีการสร้างสารพันธุกรรมของเซลล์เพิ่มขึ้น ผนังเซลล์เริ่มมีการพับในบริเวณที่จะมีการแบ่งเซลล์ ชั้น peptidoglycan และเยื่อหุ้มเซลล์จะคอดเข้าจนถึงกลางเซลล์ และเกิดการแบ่งเซลล์ที่สมบูรณ์เมื่อผนังเซลล์คอดเข้ากลางเซลล์ ซึ่งเป็นลักษณะการแบ่งเซลล์จาก 1 เป็น 2 (binary fission)

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกโพรคาริโอต (prokaryote) เช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่มีคุณสมบัติแตกต่างไป คือไซยาโนแบคทีเรียมีรงควัตถุ chlorophyll a จึงสามารถสังเคราะห์แสงได้และได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งคุณสมบัตินี้เป็นคุณสมบัติหนึ่งที่ไม่พบในแบคทีเรีย ไซยาโนแบคทีเรียได้พลังงานจากแสงสว่าง มีการดำรงชีวิตแบบ photolithotroph โดยใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งอิเล็กตรอน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน

การสังเคราะห์แสงของไซยาโนแบคทีเรียเป็นแบบที่สังเคราะห์แสงแล้วให้ออกซิเจนเป็นผลผลิต (oxygenic photosynthesis) โดยใช้น้ำในการรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์เพื่อให้ได้เป็นออกซิเจนและ ATP ในแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงได้ (photosynthetic bacterias) และไซยาโนแบคทีเรียมี photosensitive pigments และ light-absorbing carotenoid pigments ที่แตกต่างกัน ดังนี้

- แบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงได้ มักสังเคราะห์แสงแล้วไม่ให้ออกซิเจนเป็นผลผลิต (anoxygenic photosynthesis) มีรงควัตถุเรียกว่า bacteriochlorophyll a, b, c (หรือ d) มี carotenoid pigments ที่เป็น aliphatic และ aryl type ไม่ละลายน้ำ มี chromatophores

(เทียบเท่า chloroplasts) ใช้ H_2S หรือสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 fixation)

- ไชยาโนแบคทีเรีย มีรงควัตถุ chlorophyll a เช่นเดียวกับในพืชสีเขียวและสาหร่าย คูดแสงได้ดีที่ 680-683 นาโนเมตร (แสงสีแดง) มี carotenoid pigment ที่ไม่ละลายน้ำ คือ B-carotene แต่มี phycobilin (phycocyanin และ allophycocyanin) ที่ละลายน้ำ และคูดแสงได้ดีที่ 500-650 นาโนเมตร (ดีที่อยู่ที่ 625-630 นาโนเมตร) เมื่อ phycobilin ร่วมกับ chlorophyll a จึงเห็นเป็นสีน้ำเงินแกมเขียว ทั้ง carotenoid และ phycobilin มีหน้าที่ช่วยคูดพลังงานแสงแล้วส่งต่อไปให้กับ chlorophyll a ปฏิกิริยาศูนย์กลางของการสังเคราะห์แสง (Photosynthetic Unit : PS) และการขนส่งอิเล็กตรอนอยู่ที่ photosynthetic lamellae หรือ thylakoid ซึ่งมีลักษณะเป็นถุงแบนที่มีเยื่อหุ้ม ด้านนอกของเยื่อหุ้มนี้มีแกรนูล (granules) เล็กๆ เรียกว่า phycobilisome เกาะอยู่

ไชยาโนแบคทีเรียที่อาศัยในโพรงใบของแหนแดงนั้น มีศักยภาพสูงในการตรึงก๊าซไนโตรเจนให้อยู่ในรูปแอมโมเนียซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในนาข้าว ซึ่งมีน้ำขังมีการสูญเสียธาตุไนโตรเจนได้ง่ายโดยธรรมชาติ ซึ่งการเข้าสู่โพรงใบและ megasporocarp ของแหนแดงนั้นเป็นไปในรูปแบบที่มีความจำเพาะ โดยอาศัยการส่งสัญญาณ hormogonia-inducing factor, hormogonia-repressing factor และมี chemoattractants ระหว่างไชยาโนแบคทีเรียกับแหนแดง (Rai, Soderback and Bergman, 2000) มีการสันนิษฐานว่าเมื่อไชยาโนแบคทีเรียเข้าสู่เซลล์พืชแล้ว metabolism ต่างๆ ของไชยาโนแบคทีเรียจะถูกเซลล์พืชควบคุมทั้งหมด ในโพรงใบของแหนแดงมีโครงสร้างพิเศษที่ถูกสร้างไว้ เรียกว่า transfer cell ultrastructure (TCU) มีลักษณะเป็นเซลล์ชั้นยื่นออกมาจากผนังของโพรงใบ และจากภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดจะแสดงว่าสายของไชยาโนแบคทีเรียมีการพันรอบ TCU แต่ข้อมูลในส่วนที่เกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างสายของไชยาโนแบคทีเรียและ TCU ยังมีการศึกษากันน้อยมาก (Carrapico, Teixeira and Diniz, 2002)

ระบบการอยู่ร่วมกันระหว่างไชยาโนแบคทีเรียและแหนแดง

การอาศัยอยู่ร่วมกันของไชยาโนแบคทีเรียและแหนแดงเป็นแบบ symbiosis เกิดขึ้นตลอดวงชีวิตของแหนแดง และปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการเคลื่อนที่คือความชื้นและระยะการพักตัวของไชยาโนแบคทีเรีย แต่ทั้งแหนแดงและไชยาโนแบคทีเรียสามารถอยู่ในรูปอิสระได้ จากการศึกษาของ Gebhardt และ Nierzwicki-Bauer (1991) พบว่าแหนแดง *Azolla mexicana* และ *A. pinnata* สามารถรับเอาไชยาโนแบคทีเรียชนิด *Anabaena* ที่ในรูปอิสระอื่นๆเข้าไปอยู่ร่วมกันได้ และมีการพบว่าไชยาโนแบคทีเรียชนิดใหม่ ซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง *Anabaena* และ *Nostoc* สามารถเข้าไปอาศัยอยู่กับแหนแดง *A. filiculoides* ได้ (Baker et al., 2003) จึงอาจเป็นไปได้ที่แหนแดงของไทย

อาจมีความสัมพันธ์การอยู่ร่วมกับ ไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ ซึ่งจะทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนได้ดีกว่าແຫວງตามธรรมชาติ

ปริมาณของไนโตรเจนในรูปของไนเตรตมีผลต่อการอยู่รอดของทั้งແຫວງและไซยาโนแบคทีเรียเป็นอย่างมาก ปริมาณ KNO_3 เพียง 5mM จะเพียงพอต่อการรักษาสภาพการอยู่ร่วมกัน แต่ถ้าหากมีปริมาณมากกว่านี้จะทำให้ไซยาโนแบคทีเรียตาย นอกจากนี้ยังมีพบว่าเกลือ NaCl ความเข้มข้น 50mM จะสามารถช่วย balance การ uptake ของไนโตรเจนได้ (Rai et. al., 2001; Rai and Rai, 2003) สำหรับไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียเพียง 0.2mM ขึ้นไปจะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ nitrogenase ได้ แต่จะช่วยให้ແຫວງมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น (Maejima et al., 2002) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระบบการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียจะถูกยับยั้งการทำงานเมื่อมีไนโตรเจนในแหล่งน้ำ นั่นคือແຫວງและไซยาโนแบคทีเรียจะเป็นตัวควบคุมการตรึงไนโตรเจนให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช

เนื่องจากແຫວງเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีต้นทุนการผลิตต่ำมากแต่สามารถเพิ่มผลผลิตข้าวได้สูง ในที่นี้ทั่วไประยะสังเกตได้ว่าແຫວງไม่มีແຫວງหลงเหลืออยู่เลย เหตุนี้เนื่องจากແຫວງเป็นพืชที่งอกขึ้น หากไม่มีการเก็บรักษาสายพันธุ์ที่ดีไว้ก็อาจทำให้สูญพันธุ์ได้ ดังนั้นการเก็บรักษาสายพันธุ์ແຫວງจึงเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในฤดูกาลถัดไป สามารถนำมาปรับปรุงพันธุ์ ผสมข้ามพันธุ์เพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่เหมาะต่อการนำไปใช้ในนาข้าวที่มีสภาพแวดล้อมแตกต่างกันได้ การนำແຫວງมาใช้ในนาข้าวจึงนับว่าช่วยลดปัญหาจากการใช้ปุ๋ยซึ่งมีต้นทุนสูงกว่า ช่วยปรับสภาพแวดล้อมให้อยู่ในสมดุลกับการผลิตข้าว ลดความเสี่ยงของดินที่ได้ทำการปลูกข้าวต่อเนื่องกันมานานและยังเป็นการส่งเสริมการทำนาข้าวอย่างมีประสิทธิภาพในระบบเกษตรยั่งยืนได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมของไซยาโนแบคทีเรียในແຫວງและແຫວງในประเทศไทย
- 2) เพื่อพัฒนา ปรับปรุงประสิทธิภาพการทำปุ๋ยชีวภาพในนาข้าวอินทรีย์ด้วยແຫວງ
- 3) เพื่อทำการเพาะเลี้ยงและจัดเก็บรักษาสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูง

ขอบเขตของโครงการวิจัย

- 1) ทำการศึกษาหาความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมของไซยาโนแบคทีเรียในแหล่ง
แฉงและแหล่งน้ำที่แยกได้จากแหล่งน้ำที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือและภาค
กลางด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยา
- 2) ปรับปรุงระบบการอยู่ร่วมกันระหว่างสายพันธุ์แชนแดงและสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรีย
แล้วคัดเลือกคู่ที่ให้ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงๆ ด้วยการตรวจสอบกิจกรรมการ
ทำงานของเอนไซม์ nitrogenase และความสามารถการเจริญเติบโตในสภาวะต่างๆ
- 3) ทำการเพาะเลี้ยงและจัดเก็บรักษาแชนแดงสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูง
เพื่อแจกจ่ายให้เกษตรกรได้ไม่น้อยกว่า 2 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญเติบโตในสภาวะ
แวดล้อมต่างๆ

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 สภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเห็ดสายพันธุ์ต่างๆ

คัดเลือกเห็ดที่มีลักษณะแตกต่างกันจากแหล่งน้ำในพื้นที่บริเวณฟาร์มและสวนเกษตรอินทรีย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งมีการรวบรวมมาจากแหล่งน้ำต่างๆ ทั้งในและต่างประเทศ ซึ่งพบว่ามีการปะปนกัน (ตารางที่ 2.1) นำเห็ดที่ได้มาล้างเบาๆ ในน้ำสะอาด 2-3 ครั้งเพื่อกำจัดสิ่งเจือปนต่างๆ สำหรับการจำแนกสายพันธุ์เพื่อใช้ในการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาและการวิเคราะห์หาค่าดับของดีเอ็นเอ นำเห็ดมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนในกระถางสูง 15 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลาง 17 ซม. ที่มีอาหารเหลว N-free medium (ตารางที่ 2.2) 1 ลิตร ควบคุมสภาพแวดล้อมโดยการเลี้ยงในห้องเรือนกระจก เปลี่ยนอาหารทุกๆ สัปดาห์ สำหรับการเพิ่มจำนวนของเห็ดเพื่อใช้ในแปลงทดสอบจำเป็นต้องใช้เห็ดปริมาณมากจึงทำการเพาะเลี้ยงเห็ดในท่อซีเมนต์ขนาด 2 ตร.ม. ประกอบไปด้วยดิน 2 กก. ควบคุมระดับน้ำให้สูงประมาณ 5-10 ซม. ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแวดล้อมปกติ โดยใช้ปริมาณเห็ดเริ่มต้น 0.2 ก./ตร.ม. และใส่ปุ๋ยฟอสเฟตทุกๆ 7 วัน

ตารางที่ 2.1 สายพันธุ์เห็ดที่คัดเลือกมาใช้ในการศึกษา

สายพันธุ์	แหล่ง
AZO1	สวนเกษตรอินทรีย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประเทศไทย
AZO2	ฟาร์มมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประเทศไทย
AZO3	ฟาร์มมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประเทศไทย

ตารางที่ 2.2 การเตรียม stock ของอาหารเหลว N-free medium

Stock solution	สารเคมี	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)
1	CaCl ₂	55.50
2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	49.50
3	KCl	37.50
4	KH ₂ PO ₄	13.60
5	FeEDTA.Na	30.00

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Stock solution	สารเคมี	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)
6	Micro nutrient ประกอบด้วย	
	H ₃ BO ₃	2.86
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.10
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.08
	MoO ₃	0.02

2.2 การจำแนกโดยลักษณะทางสรีระวิทยา

2.2.1 การศึกษาลักษณะโครงสร้างของ vegetative และ reproductive โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างชิ้นแรกนำตัวอย่างของใบและ sporocarp ของแหนแดงที่คัดเลือกได้มาแช่ใน glutaraldehyde 2.0% ใน 0.1M phosphate buffer pH 6.8 เป็นเวลาอย่างต่ำ 1 ชม.หรือแช่ทิ้งไว้ค้างคืนเพื่อทำการตรึงตัวอย่างให้คงอยู่ในสภาพเดิม ต่อจากนั้นนำมาล้างด้วย phosphate buffer 3 ครั้งๆละ 10-15 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ใน osmium tetroxide 1% เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ต่อจากนั้นนำตัวอย่างมาตั้งน้ำออกอย่างช้าๆด้วยการล้างด้วยเอทานอลเป็นลำดับตั้งแต่ 30, 50, 70, 90, 95 และ 100% เป็นเวลา 10-15 นาที ชุดละ 2 ครั้ง ตัวอย่างที่ได้จะนำไปทำแห้งโดยการใช้เครื่อง critical point dryer หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปหุ้มด้วยทองคำด้วยเครื่อง ion sputter นำตัวอย่างที่ได้ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 85, 100, 120, 200 และ 800 เท่าเพื่อศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาที่เหมือนหรือแตกต่างกันของแหนแดงสายพันธุ์ต่างๆ

2.2.2 การศึกษาลักษณะการอยู่ร่วมกันของแหนแดงและไซยาโนแบคทีเรีย (*Azolla-Anabaena symbiosis*)

ในการศึกษาไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena azollae* ในโพรงใบของแหนแดง ชิ้นแรกนำใบของแหนแดงมาผ่าตามยาวและตามขวางไปแช่ใน glutaraldehyde 2.5% ใน 0.1M phosphate buffer pH 6.8 หลังจากนั้นนำไปแช่ใน OsO₄ นำตัวอย่างมาตั้งน้ำออกอย่างช้าๆด้วยการล้างด้วยเอทานอลเป็นลำดับ นำตัวอย่างที่ได้ไปฝังลงใน Spurr's resin ตัดตัวอย่างที่ได้ด้วยเครื่อง ultramicrotome ย้อมตัวอย่างที่ได้ด้วย toluidine blue 1 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า ต่อจากนั้นย้อมด้วย basic fuchsin เป็นเวลา

30 วินาที ล้างด้วยน้ำเปล่าอีกครั้ง ส่งคุณลักษณะการอยู่ร่วมกันของแหวนแดงและไซยาโนแบคทีเรีย ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า

2.3 การจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ

2.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากรากของแหวนแดงตามวิธีของ Dellaporta และคณะ(1983) ขั้นแรกนำรากไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส บดด้วยไนโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นผง เติมนัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด(ประกอบด้วย 1M Tris-HCl pH 8.0, 0.5M EDTA, 5M NaCl and 10% SDS) 720 ไมโครลิตร นำส่วนใสที่ได้เปลี่ยนใส่หลอดใหม่นำไปบ่มที่ 65°C เขย่าทุกๆ 5 นาทีเป็นเวลา 15-20 นาที ต่อจากนั้นเติม 5M NaOAc ผสมเบาๆให้เข้ากันนำไปบ่มบนน้ำแข็งพร้อมเขย่าเป็นเวลา 20 นาที ต่อจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสที่ได้ใส่หลอดใหม่ เติมนิฟีนอล (phenol) ในปริมาณเท่ากัน ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol เย็น ล้างส่วนที่ตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็น ปล่อยให้แห้งและเติมนัฟเฟอร์ TE เพื่อเก็บรักษาดีเอ็นเอ ต่อจากนั้นเติมเอ็นไซม์ RNAse บ่มที่ 55°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอที่ -20°C

2.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการใช้ไพรเมอร์ NS1, NS2 และ ITS1, ITS4 (White และคณะ, 1990) ใช้ปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร สำหรับไพรเมอร์ NS ใช้ปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนดังนี้ ขั้นแรกให้ความร้อน 95°C เป็นเวลา 5 นาที ในขั้นตอนที่สองลดอุณหภูมิลง 95°C เป็นเวลา 30 วินาที 45°C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 1 นาทีทำทั้งหมดจำนวน 40 รอบ และในขั้นตอนสุดท้ายทำปฏิกิริยาที่ 72°C เป็นเวลา 10 นาที สำหรับไพรเมอร์ ITS ใช้ปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนดังนี้ ขั้นแรกให้ความร้อน 95°C เป็นเวลา 2 นาที ในขั้นตอนที่สองลดอุณหภูมิลง 95°C เป็นเวลา 30 วินาที 50-60°C (ขึ้นอยู่กับดีเอ็นเอแม่แบบของแต่ละสายพันธุ์) เป็นเวลา 30 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 45 วินาทีทำทั้งหมดจำนวน 35 รอบ และในขั้นตอนสุดท้ายทำปฏิกิริยาที่ 72°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นทำการตรวจสอบผลของ PCR product ที่ได้โดยการใช้ 1% agarose gel electrophoresis

2.3.3 การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ

นำ PCR product ที่ได้จากแหวนแดงแต่ละสายพันธุ์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้ PCR purification Kit นำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส นำลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับเบสของแหวนแดงสายพันธุ์ต่างๆจากในฐานข้อมูลของ Genebank ด้วยโปรแกรม BLAST

ตารางที่ 2.3 ไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้ในเทคนิค PCR และการหาลำดับเบส (sequencing)

Primer	5'-sequence-3'
NS1 (F)	GTA GTC ATA TGC TTG TCT C
NS2 (R)	GGC TGC TGG CAC CAG ACT TGC
ITS1 (F)	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
ITS4 (R)	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC

(F) และ (R) แทน forward and reverse primers ตามลำดับ

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของการใช้แทนแฉงในนาข้าว

การทดสอบประสิทธิภาพการใช้แทนแฉงในนาข้าวโดยทำการเตรียมแปลงปลูกที่สวนเกษตรอินทรีย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ใช้ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ทำการทดลองในช่วงเดือนสิงหาคม 2549 - เดือนธันวาคม 2549 เตรียมกล้าข้าวเป็นเวลา 30 วันโดยแปลงที่ใช้ในการทดลองจะทำการไถตะ ไถแปร ทำเทือกสูงประมาณ 30 ซม. กันทุกแปลง โดยแบ่งทำเป็นแปลงย่อยขนาด 2 x 4 เมตร ระยะห่างระหว่างกอ 25 x 25 ซม. โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block ทำการทดลองทั้งหมด 5 treatments อย่างละ 3 ซ้ำ ประกอบไปด้วย

- Treatment ที่ 1 ใช้แทนแฉง AZO1
- Treatment ที่ 2 ใช้แทนแฉง AZO2
- Treatment ที่ 3 ใช้แทนแฉง AZO3
- Treatment ที่ 4 ใช้ปุ๋ยเคมี N-P₂O₅-K₂O อัตราส่วน 12-8-8 กก./ไร่ (0.075-0.05-0.05 ตัน/เฮกแตร์)
- Treatment ที่ 5 ไม่มีทั้งแทนแฉงและปุ๋ยเคมี

ใช้แทนแฉงอัตรา 250 กรัม /ตร.ม. รักษาระดับน้ำให้คงที่ทำการเพาะเลี้ยงแทนแฉงก่อนเป็นเวลา 4 สัปดาห์แล้วไถกลบวันปักดำข้าว ทำการใส่แทนแฉงและปุ๋ยอีกครั้งเมื่อผ่านไป 45 วันหลังจากนั้นทำการสังเกตน้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของแทนแฉงโดยการหา doubling time การเจริญเติบโตของข้าว (ความสูง จำนวนต้น/กอ จำนวนเมล็ด/รวง และน้ำหนักเมล็ดแห้ง) และบันทึกผลการทดลอง โดย

ในการเก็บเกี่ยวจะเว้นขอบแปลงทุกด้านเพื่อหลีกเลี่ยง border effect สูตรที่ใช้ในการหา doubling time คือ

$$\text{Doubling time} = \ln 2 / \text{RGR},$$

$$\text{RGR (Relative growth rate)} = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t^1)$$

W_1 = น้ำหนักเริ่มต้น W_2 = น้ำหนักสุดท้าย และ t = จำนวนวันที่ใช้ในการเลี้ยง (Mitchell, 1974)

2.5 การวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของແໜແດງໃນແຕ່ລະສາຍພັນຮູ້

การวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในขั้นแรกจะทำการเลี้ยงແໜແດງໃນอาหารเหลว N-free เมื่อผ่านไป 21 วัน นำແໜແດງ 2-3 กรัม มาใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. ที่มีอาหารเหลว N-free ไปบ่มกับอะซิไทลีน (acetylene) ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 °C เป็นเวลา 2 ชม. เพื่อหาอัตราการเจริญเติบโตและนำไปวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยใช้วิธี Acetylene Reduction Assay ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ในการเปลี่ยนอะซิไทลีน ไปเป็นเอทิลีน (ethylene) ซึ่งจะวิเคราะห์หาปริมาณอะซิไทลีนที่เหลือและปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Gas Chromatography โดยทำการบ่มແໜແດງด้วยอะซิไทลีนเป็นเวลา 2 ชม. ก่อนนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gas chromatography (AutoSystem XL, PerkinElmer, U.S.A.) โดยใช้ PE-Alumina column

2.6 การวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด

นำตัวอย่างແໜແດງไปอบที่ 70 °C เป็นเวลา 24 ชม. บดตัวอย่างให้ละเอียด ซึ่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม บดที่น้ำหนักที่แน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ลงในหลอด Kjeldahl และใช้หลอดเปล่า 1 หลอดเป็น sample blank เติม mixed catalyst (ผสม K_2SO_4 : $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ อัตราส่วน 100:10) ลงไปประมาณ 5 กรัม เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้นลงไป 20 มล. เขย่าให้ส่วนผสมทั้งหมดคลุกเคล้ากัน นำไปย่อยใน digestion block ในตู้ดูดควันที่อุณหภูมิ 400 °C ประมาณ 2 ชม. จนกระทั่งสีของสารละลายที่ย่อยใสหรือสีขาวขุ่น ทิ้งไว้ให้เย็น เติมสารละลายกรดบอริก 50 มล. ลงในขวดชมพู่ขนาด 125 มล. นำตัวอย่างที่ย่อยได้ไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่น ก่อนเริ่มกลั่นเติมน้ำกลั่นลงไป 50 มล. เติมสารละลาย 35% NaOH ลงไป 25 มล. ใช้กรดบอริกจากข้อ 5 จับแก๊สแอมโมเนียที่เกิดขึ้น สีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเขียว ได้สารละลายที่กลั่นแล้ว นำกรดบอริกที่ได้ไปไตเตรทด้วยสารละลาย 0.1 M HCl จนสีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีชมพูเทียบกับ blank

ความเข้มข้นของไนโตรเจนทั้งหมด คำนวณได้จาก

$$\% \text{ ในโตรเจน (Total N)} = \frac{N \times (V-B) \times 14 \times 100}{W}$$

- เมื่อ N = ความเข้มข้นของกรด HCl (M)
V = ปริมาตรของกรด HCl ที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มล.)
B = ปริมาตรของกรด HCl ที่ใช้ไตเตรทกับ blank (มล.)
W = น้ำหนักของตัวอย่าง (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

2.7 การวิเคราะห์ดิน

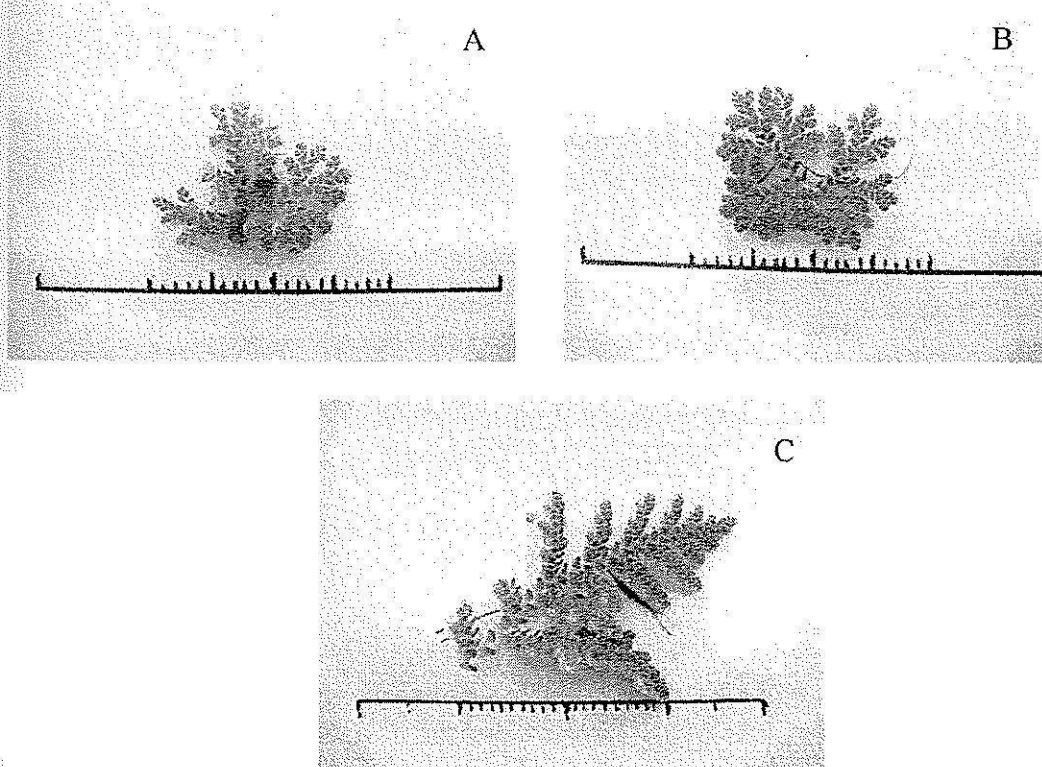
เก็บตัวอย่างดินจากแปลงทดสอบทั้งก่อนและหลังทำการทดสอบ นำดินที่ได้ไปผึ่งลมให้แห้ง นำไปร่อนผ่านตะแกรง ขนาด 0.2 มม. นำตัวอย่างดินส่งวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และอินทรีย์วัตถุ ที่ภาควิชาทรัพยากรที่ดินและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทที่ 3
ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของแหนแดง

3.1.1 ลักษณะทางโครงสร้างของแหนแดง

แหนแดงทุกสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาจากแหล่งน้ำภายในฟาร์มและสวนเกษตรอินทรีย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่มีการรวบรวมมาจากแหล่งน้ำในประเทศและต่างประเทศซึ่งปะปนกันอยู่ ในการจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ จะทำการเลี้ยงแหนแดงในสารละลายอาหาร N-free ภายใต้อุณหภูมิห้องในการศึกษาขั้นแรกจะทำเมื่อแหนแดงมีอายุได้ 14 วัน โดยจะนำมาศึกษาลักษณะโครงสร้างทาง vegetative ภายใต้อุปกรณ์ stereo ดังรูปที่ 3.1 โดยสายพันธุ์ AZO1 และ AZO2 ต้นแหนแดงจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 ซม ส่วน AZO3 มีความยาวประมาณ 2.5 ซม ซึ่งการสังเกตลักษณะโครงสร้างเบื้องต้นนี้จำแนกได้ว่าแหนแดงทั้ง 3 สายพันธุ์จัดอยู่ใน section *Azolla* (ประกอบไปด้วยสายพันธุ์ *A. caroliniana* *A. filiculoides* *A. mexicana* *A. microphylla* และ *A. rubra*) ตาม tentative identification key (Lumpkin and Plucknett, 1982) ซึ่งแหนแดงใน section นี้ใบที่กำลังเจริญจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-3 ซม เจริญเติบโตในแนวนอน

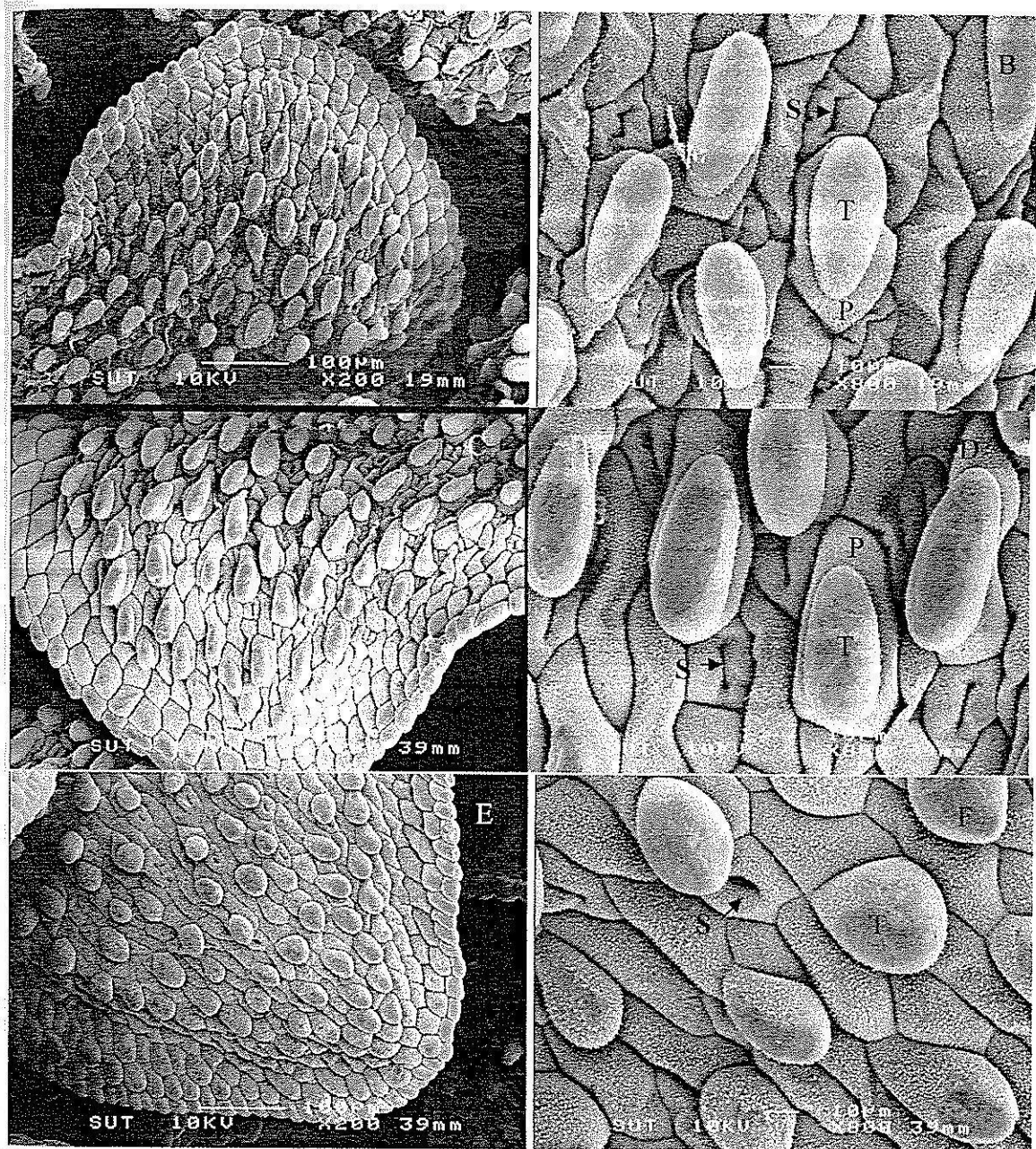


รูปที่ 3.1 ลักษณะทางสรีรวิทยาของโครงสร้าง vegetative ภายใต้อุปกรณ์ stereo ที่กำลังขยาย 0.67 เท่า

A) AZO1, B) AZO2 and C) AZO3

ในปีค.ศ. 1976 Martin ได้แนะนำว่าลักษณะบางอย่างเช่น ชนิดของขนใบ (trichome หรือ epidermal leaf hair) เป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์แหวนแดง จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาลักษณะขนใบซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้าง vegetative โดยสังเกตความแตกต่างของขนใบในแต่ละสายพันธุ์ด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ดังผลที่แสดงในรูปที่ 3.2 โดยลักษณะขนใบของสายพันธุ์ AZO3 จะมีรูปร่างค่อนข้างกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30-40 ไมโครเมตร ในขณะที่สายพันธุ์ AZO1 และ AZO2 มีรูปร่างเป็นวงรี กว้างประมาณ 20 ไมโครเมตร ยาว 50 ไมโครเมตร โดยในทุกสายพันธุ์พบว่าขนใบและปากใบ (stomata) มีลักษณะเรียงตัวกันเป็นแถวในแนวตั้ง พบขนใบ 1 เซลล์หรือมากกว่า

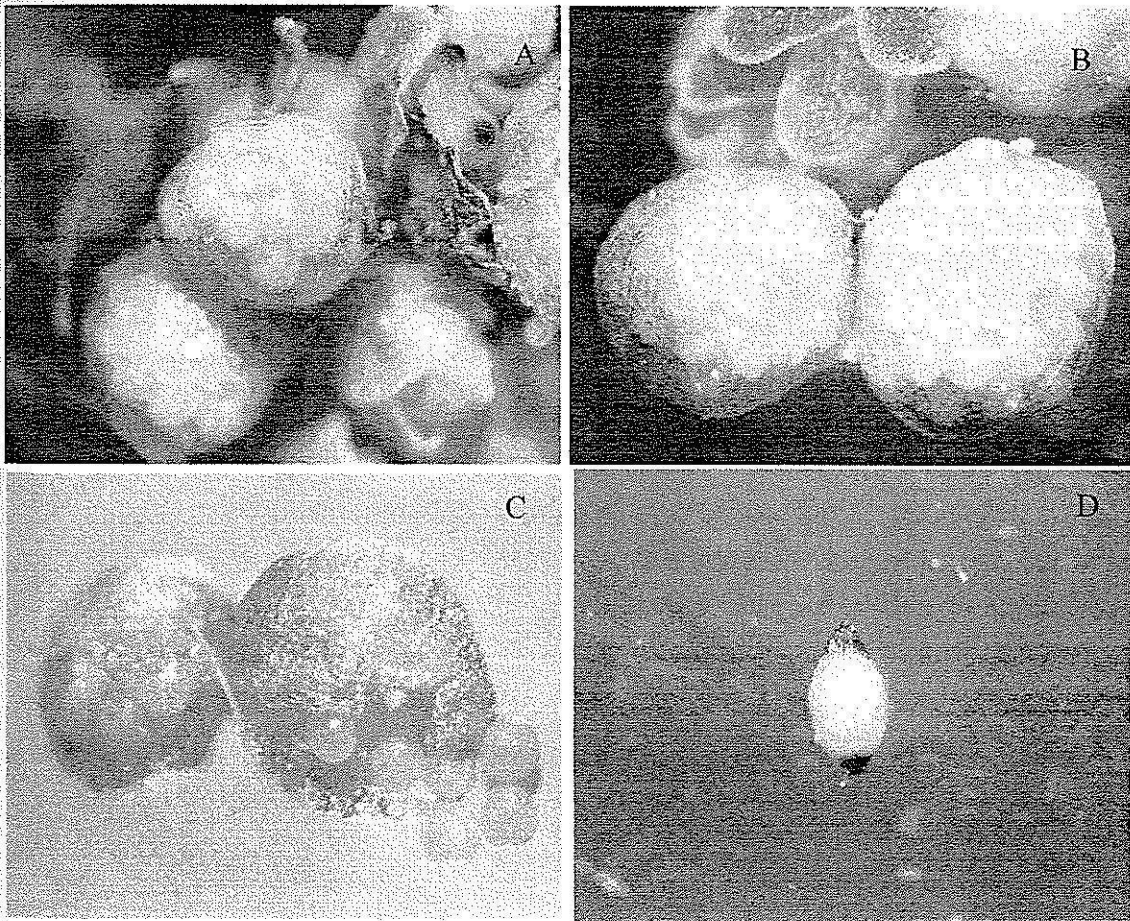
ตามการจำแนกของ Lumpkin และ Plucknett (1980) เซลล์ขนใบเป็นส่วนหนึ่งที่ใช้สำหรับจำแนกสายพันธุ์ของแหวนแดง โครงสร้างของเซลล์ขนใบประกอบด้วย 2 เซลล์ คือ ก้านเซลล์ (pedicel cell) และส่วนปลายหรือยอดของขนใบ (apical trichome cell) จากรูป 3.2 A และ B พบว่า AZO1 มียอดเซลล์ 1 เซลล์ และก้านเซลล์ 1 เซลล์ สายพันธุ์ AZO2 (รูป 3.2 C และ D) แสดงให้เห็นฐานหรือก้านเซลล์ที่กว้างกว่ายอดขนใบครั้งหนึ่งหรือมากกว่าและพบว่าเซลล์ขนใบตั้งฉากกับก้านเซลล์ ส่วนสายพันธุ์ AZO3 (รูป 3.2 E และ F) พบเซลล์ขนใบเดี่ยวซึ่งแยกออกอย่างชัดเจนจากผิวใบ อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้สามารถจำแนกได้ว่าสายพันธุ์แหวนแดงที่คัดเลือกมานี้จัดจำแนกอยู่ใน section *Azolla* (*A. caroliniana*, *A. filiculoides*, *A. mexicana*, *A. microphylla* และ *A. rubra*) แต่เนื่องจากลักษณะโครงสร้างของ vegetative บางส่วนในแต่ละสายพันธุ์ยังมีความคล้ายคลึงกัน การทดลองต่อไปจึงได้ศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของแหวนแดง (sporocarp)



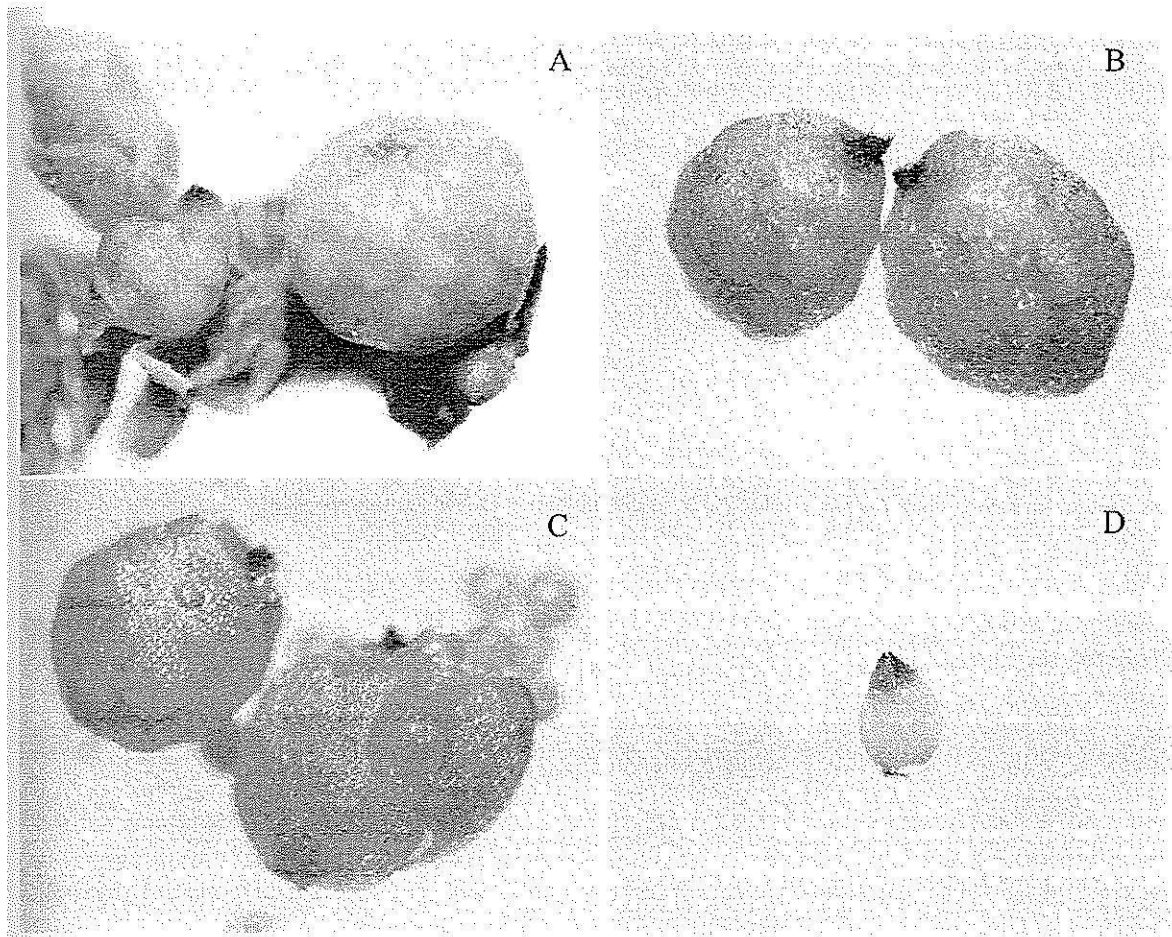
รูปที่ 3.2 รูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของขนใบ (epidermal trichomes); (A-B) รูปผิวใบและขนใบของ AZO1; (C-D) รูปผิวใบและขนใบของ AZO2; (E-F) รูปผิวใบและขนใบของ AZO3 T คือ ปลายหรือยอดของขนใบ (apical trichome cell) P คือ ก้านเซลล์ (pedicel cell) และ S คือ ปากใบ (stomata) รูป A, C และ E กำลังขยาย = x200 รูป B, D และ F กำลังขยาย = x800

3.1.2 ลักษณะทางโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

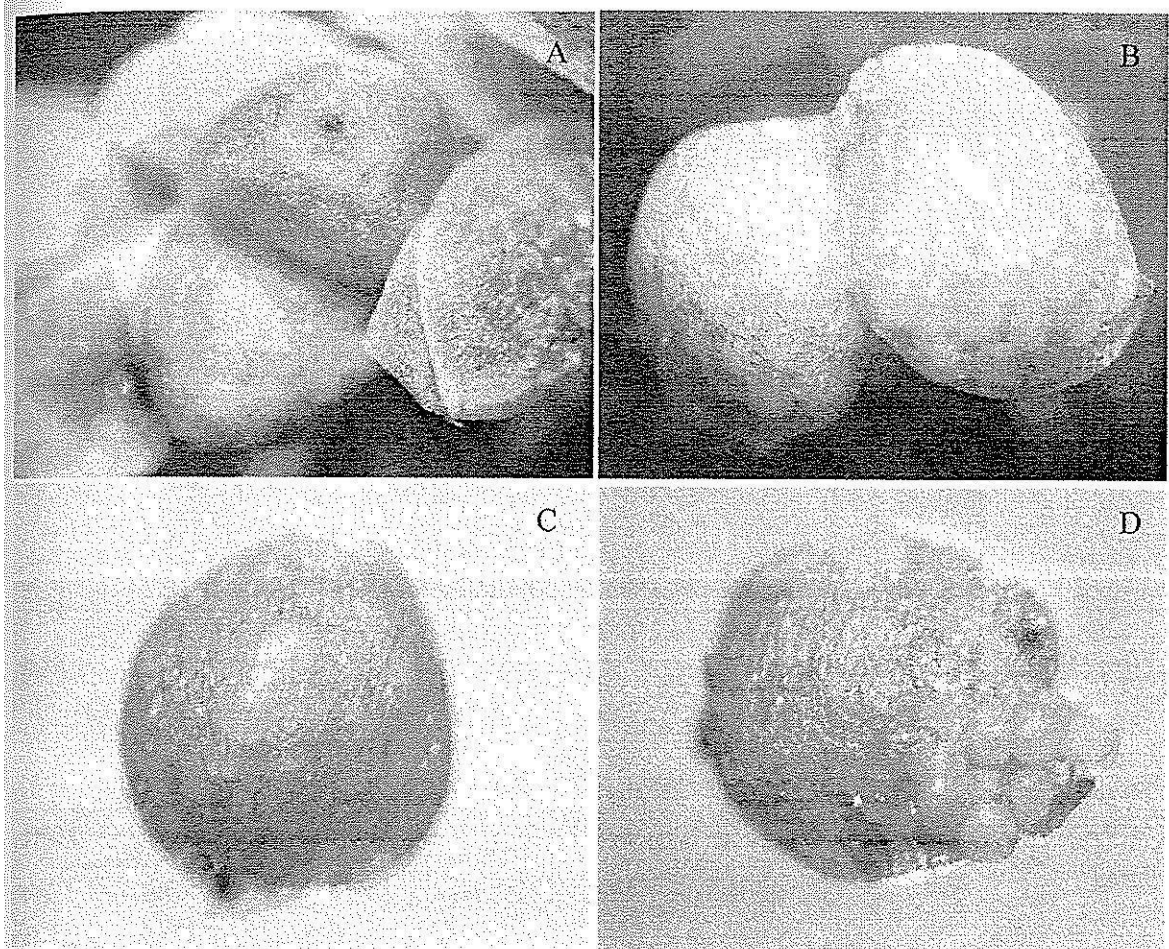
ทำการศึกษาลักษณะทางโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sporocarp) โดยใช้กล้อง stereo และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (SEM) sporocarp ของเห็ดแดงแต่ละสายพันธุ์จะพบอยู่เป็นคู่ตรงผิวของท้องใบยึดอยู่บริเวณก้านใบ การจับคู่สปอร์นี้อาจจับคู่อยู่ระหว่างสปอร์เพศเมีย (megaspore) ซึ่งภายในสปอร์จะมีสปอร์เล็กๆอยู่หนึ่งสปอร์ (megasporangium) และสปอร์เพศผู้ (microspore) ซึ่งภายในประกอบไปด้วยสปอร์เล็กๆมากมาย (microsporangia) (รูปที่ 3.3C, 3.4C และ 3.5D) หรืออาจจับคู่สปอร์ระหว่างเพศเดียวกันก็ได้ สปอร์เพศผู้ (รูปที่ 3.3B, 3.4B และ 3.5B) มีขนาดใหญ่กว่าสปอร์เพศเมีย (รูปที่ 3.3D และ 3.4D) ในการศึกษาจะพบสปอร์เพศผู้มากกว่าสปอร์เพศเมีย และจะพบการจับคู่สปอร์เพศเดียวกันมากกว่าการจับคู่ระหว่างสปอร์ (รูปที่ 3.3-3.6)



รูปที่ 3.3 ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้อง stereo ของเห็ดแดงสายพันธุ์ AZOI ที่กำลังขยาย 4.5 เท่า (A) สปอร์เพศผู้และสปอร์เพศเมียที่จับคู่อยู่กับต้นเห็ดแดง (B) สปอร์เพศผู้ที่แยกออกมาจากต้น (C) สปอร์ขนาดเล็กที่อยู่ภายในสปอร์เพศผู้ (D) สปอร์เพศเมีย

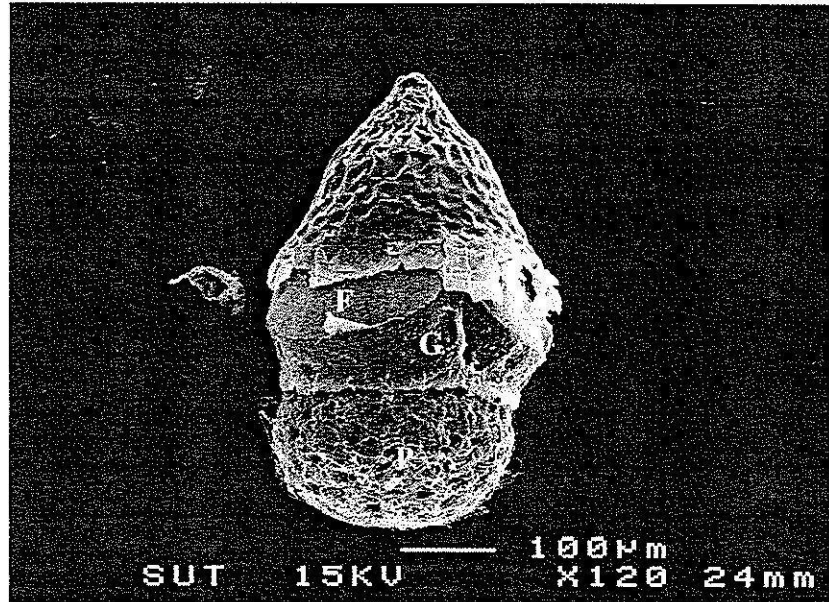


รูปที่ 3.4 ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้อง stereo ของแทนแดงสายพันธุ์ AZO2 ที่กำลังขยาย 4.5 เท่า (A) สปอร์เพศผู้และสปอร์เพศเมียที่จับคู่อยู่กับต้นแทนแดง (B) สปอร์เพศผู้ที่แยกออกมาจากต้น (C) สปอร์ขนาดเล็กที่อยู่ภายในสปอร์เพศผู้ (D) สปอร์เพศเมีย

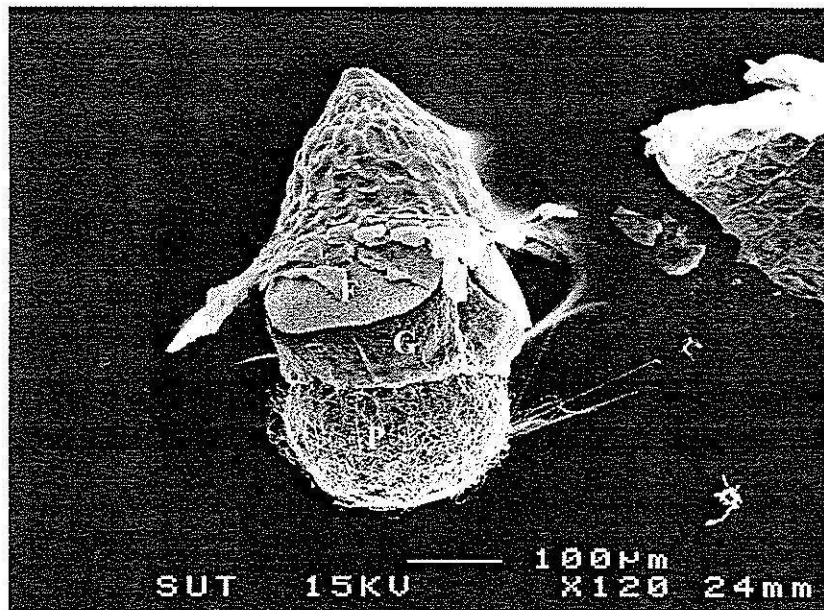


รูปที่ 3.5 ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้อง stereo ของเห็ดแดงสายพันธุ์ AZO3 ที่กำลังขยาย 4.5 เท่า (A) สปอร์เพศผู้ที่จับคู่อยู่กับดินเห็ดแดง (B-C) สปอร์เพศผู้ที่แยกออกมาจากดิน (D) สปอร์ขนาดเล็กที่อยู่ภายในสปอร์เพศผู้

สปอร์เพศเมีย (megasporocarp) เจริญมาจาก megasporangium เมื่อสปอร์เพศเมียเจริญสมบูรณ์เต็มที่ เซลล์ periplasmodium จะแบ่งเป็น 4 ส่วน หนึ่งในสี่ส่วนนั้นเป็นเซลล์ทั่วไปที่ห่อหุ้มสปอร์ไว้เรียกว่า perispore ซึ่งส่วนนี้จะเจริญขยายตัวมากขึ้นห่อหุ้มสปอร์ไว้เป็นส่วนที่เรียกว่า perine รวมถึงส่วนที่เรียกว่า grundle (รูปที่ 3.6 และ 3.7) นอกจากนี้ทุ่นลอย (float) ยังเป็นส่วนหนึ่งของสปอร์ที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเห็ดแดงซึ่งจำแนกโดยการนับจำนวนของทุ่นลอยที่พบ โดยทั้งสายพันธุ์ AZO1 และ AZO2 พบว่ามีทุ่นลอย 3 อัน (ส่วนในสปอร์เพศเมียของสายพันธุ์ AZO3 ไม่พบทุ่นลอย)

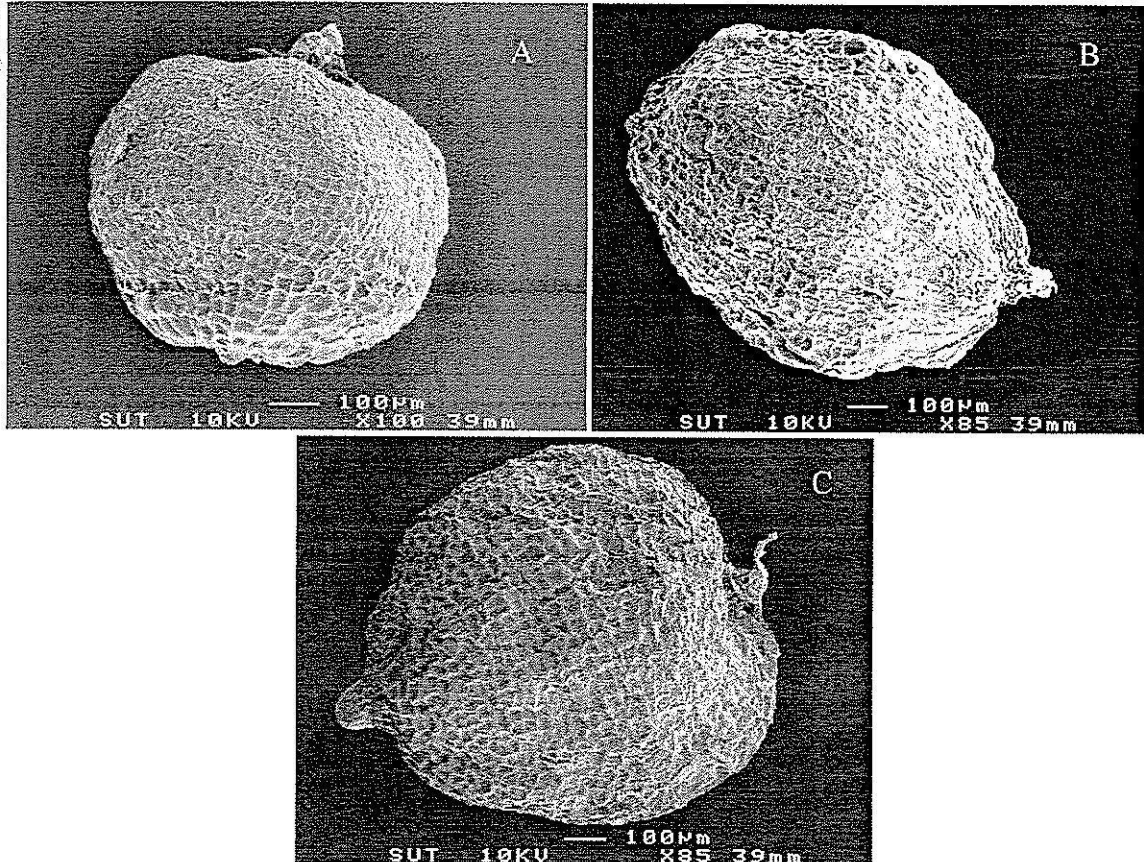


รูปที่ 3.6 สปอร์เพศเมียของແໜແຈງສາຍພັນຊື່ AZO1 ທີ່ແທ້ງ perispore ຫຼື purine (P) ທີ່ຫ້ອຸ້ມ ສປອຣ໌ເປັສເມີຍ ໂດຍລັກຊະນະທ້ວ່າໄປຂອງສປອຣ໌ເປັສເມີຍທີ່ພບກື້ໍ grindle (G) ແລະ float (F) ກ້ໍລັງຂຍາຍ = 120 ທ່ໍາ scale bar = 100 ມິໂຕຣເມັຕຣ



รูปที่ 3.7 สปอร์เพศเมียของແໜແຈງສາຍພັນຊື່ AZO2 ທີ່ແທ້ງ perispore ຫຼື purine (P) ທີ່ຫ້ອຸ້ມ ສປອຣ໌ເປັສເມີຍ ໂດຍລັກຊະນະທ້ວ່າໄປຂອງສປອຣ໌ເປັສເມີຍທີ່ພບກື້ໍ grindle (G) ແລະ float (F) ກ້ໍລັງຂຍາຍ = 120 ທ່ໍາ scale bar = 100 ມິໂຕຣເມັຕຣ

สปอร์เพศผู้จะชักนำให้เกิดการเจริญของต้นอ่อน (gametophyte) สปอร์เพศผู้ที่พบในการศึกษานี้มีลักษณะกลมค่อนข้างแบน ในสายพันธุ์ AZO1 และ AZO3 สปอร์เพศผู้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร ส่วนสปอร์เพศผู้ของสายพันธุ์ AZO2 มีลักษณะรูปไข่ ยาวประมาณ 1.1 มม. เส้นผ่าศูนย์กลางวัดจากจุดที่กว้างที่สุดไปหาปลายที่เรียวที่สุดได้ประมาณ 0.9 มม. (รูปที่ 3.8)



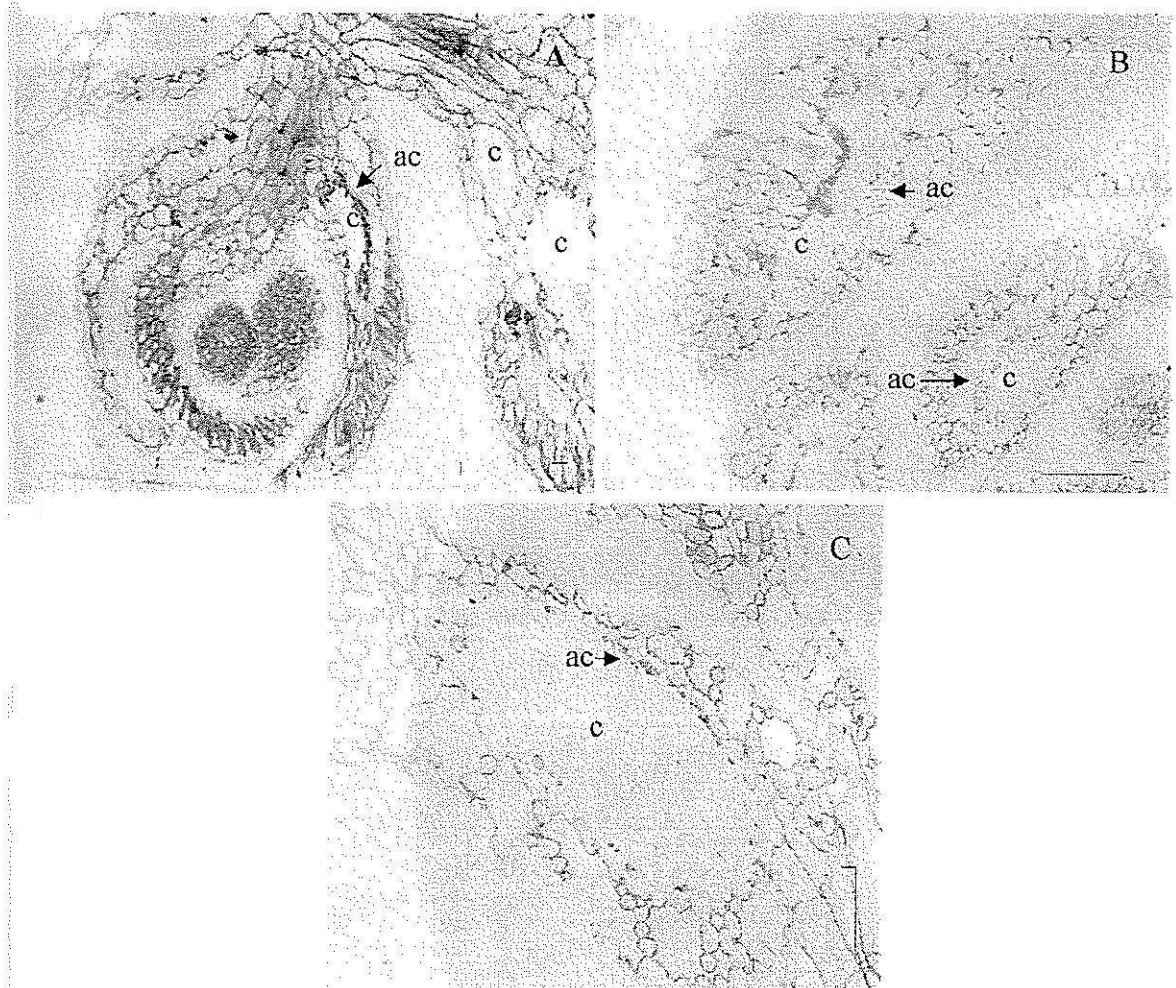
รูปที่ 3.8 รูปด้านข้างของสปอร์เพศผู้ที่เจริญเต็มที่ (A) สายพันธุ์ AZO1 (กำลังขยาย 100 เท่า) (B) สายพันธุ์ AZO2 (กำลังขยาย 85 เท่า) และ (C) สายพันธุ์ AZO3 (กำลังขยาย 100เท่า) scale bar = 100 ไมโครเมตร

จากผลการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของแหวนแดง (โครงสร้างทาง vegetative และโครงสร้างการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ) สามารถสรุปได้ว่าแหวนแดงทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่ใน section *Azolla* สายพันธุ์ AZO1 ในต้นที่เจริญเต็มที่ใบมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซม พบก้านและปลายยอดขนใบอย่างละ 1 เซลล์ พบท่อนลอย 3 อัน ซึ่งจากผลการศึกษาสรุปได้ว่าแหวนแดงสายพันธุ์ AZO1 คือสายพันธุ์ *A. microphylla* ในสายพันธุ์ AZO2 ในต้นที่เจริญเต็มที่ใบมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซม ฐานหรือก้านเซลล์กว้างกว่ายอดขนใบครึ่งหนึ่งหรือมากกว่าและพบว่าเซลล์ขนใบตั้งฉากกับก้าน

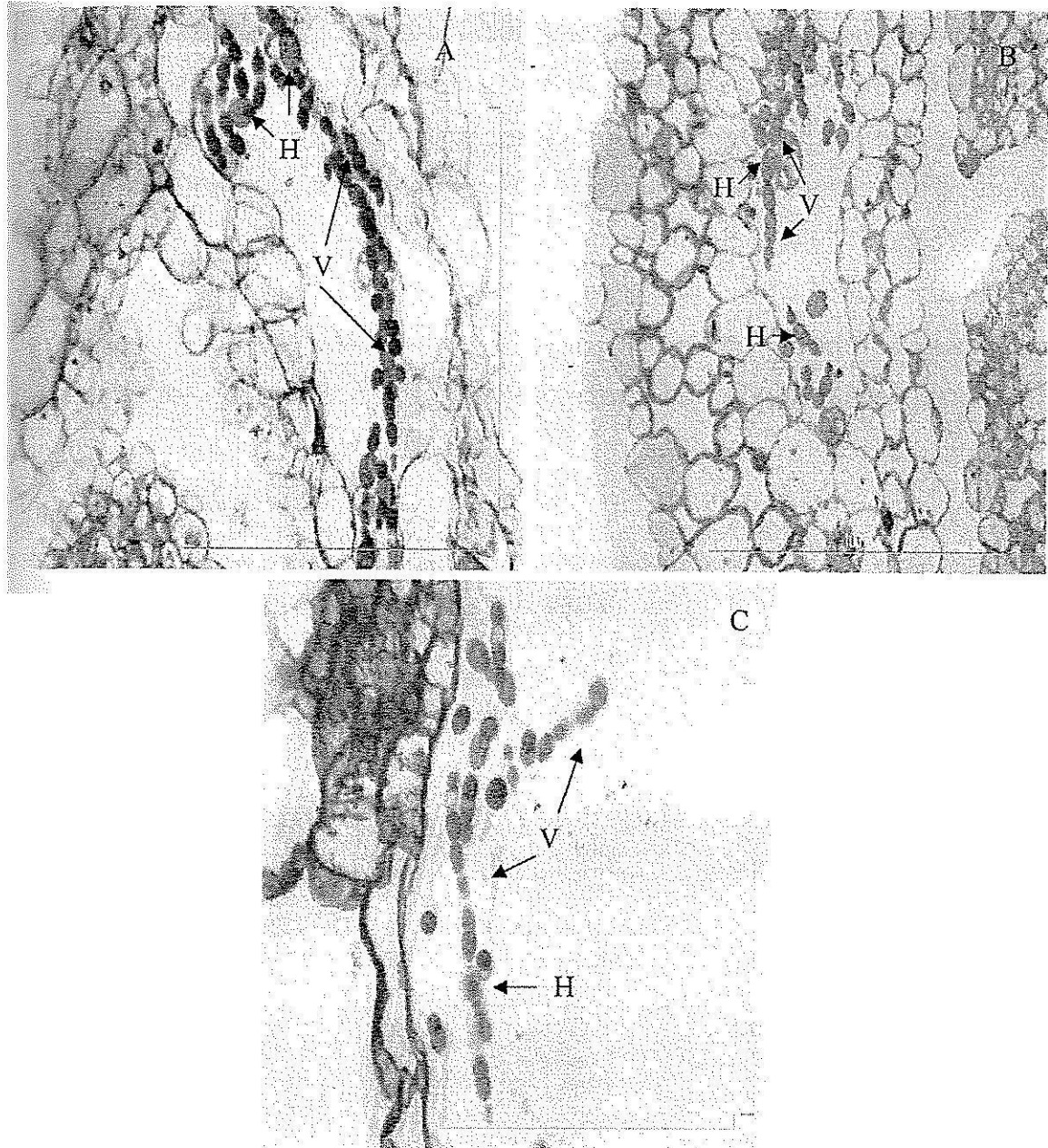
เซลล์ มีทุ่นลอย 3 อัน ลักษณะที่ใช้ในการจำแนกด้วยขนาดของก้านเซลล์ที่กว้างนี้ เป็นเพียงบางส่วนที่ใช้ในการจำแนกเท่านั้นเนื่องจากมีหลายสายพันธุ์ที่มีลักษณะโครงสร้างดังกล่าวมานี้ ซึ่งจะเรียกรวมกันว่าสายพันธุ์ *A. cristata* (Dunham and Fowler, 1987) (เรียกรวมทั้ง *A. mexicana* *A. caroliniana* และ *A. microphylla*) ส่วนสายพันธุ์ AZO3 ในต้นที่เจริญเต็มที่ใบมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 ซม พบเซลล์ขนใบเซลล์เดี่ยวแยกออกอย่างชัดเจนจากผิวใบจำแนกได้ว่าเป็น สายพันธุ์ *A. filiculoides* ซึ่งสายพันธุ์นี้มีลักษณะ โครงสร้างของ vegetative ที่แตกต่างกับสายพันธุ์อื่นๆอย่างชัดเจน

3.1.3 ลักษณะการอยู่ร่วมกันของແຫນແຕງແລະສາหร່າຍສີເຂົ້ວແກມນ້ຳເງິນ (*Azolla-Anabaena* endosymbiont)

ในการศึกษา *Anabaena azollae* สาหร่ายสีเขี้ยวแถมน้ำเงินที่อยู่ในโพรงใบของແຫນແຕງ ทำโดยการนำใบແຫນແຕງมาตัดตามขวางและนำมาศึกษาค้นคว้าด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในระยะที่สมบูรณ์เต็มที่โพรงใบจะมีรูปทรงกลมรีคล้ายไข่ ภายในโพรงใบบริเวณช่องแคบที่อยู่รอบเส้นรอบวงจะพบ *A. azollae* ยึดอยู่กับภายในโพรงใบดังรูปที่ 3.9 จากการศึกษาพบลักษณะเซลล์สองแบบคือเซลล์ vegetative และเซลล์ heterocyst ในทั้งสายพันธุ์ AZO1 AZO2 และ AZO3 (รูปที่ 4.10) สายของสาหร่ายสีเขี้ยวแถมน้ำเงินนี้ส่วนมากจะพบเซลล์ vegetative โดยลักษณะของเซลล์นี้จะพบเป็นเซลล์เดี่ยวๆมีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกัน โดยลักษณะนี้ก็จะแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ ส่วนเซลล์ heterocyst จะมีลักษณะและรูปร่างแตกต่างจากเซลล์ vegetative เพราะเซลล์มีขนาดใหญ่ ผนังเซลล์หนา รูปร่างค่อนข้างกลม



รูปที่ 3.9 ภาพผ่าตามยาวของส่วนท้องใบแหวนแดงแต่ละสายพันธุ์ที่เจริญเต็มที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
 AZO1 (A) AZO2 (B) AZO3 (C) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Anabaena azollae* ยึดติดอยู่ในโพรงใบ c= โพรงใบ (cavity) ac = เซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (*Anabaena* cell)
 กำลังขยาย = 400 เท่า



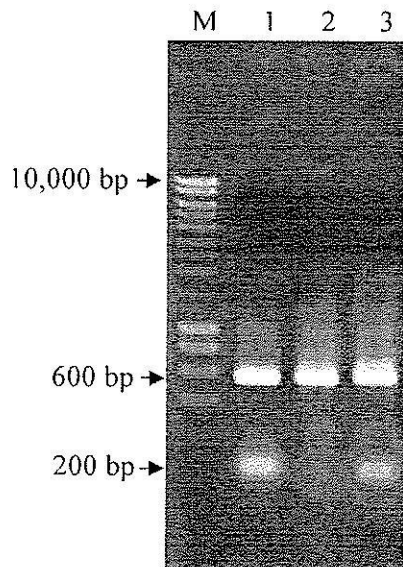
รูปที่ 3.10 ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่อยู่ร่วมกับแหนแดงสายพันธุ์ AZO1 AZO2 และ AZO3 ในรูป A B และ C ตามลำดับ V = เซลล์ทั่วไป (vegetative cell) H = เซลล์ที่ทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจน (heterocyst cell) ศึกษาที่กำลังขยาย 1000 เท่า

ในปี 1987 Dunham และ Fowler เสนอการจำแนกสายพันธุ์เหินแดงโดยสังเกตจากลักษณะของ vegetative และ reproductive ด้วยกล้องจุลทรรศน์ การตัดตามขวางศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าบางส่วนของขนใบ ลักษณะบางอย่างของโครงสร้าง vegetative สามารถนำมาใช้ในการจะแนกเหินแดงได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้นดังเช่นการทดลองนี้ โดยวิธีจำแนกที่ได้ผลแม่นยำที่สุดคือการจำแนกโดยใช้ลักษณะของสปอร์เพศเมีย (megaspore) ในการจำแนกสายพันธุ์ *A. filiculoides* *A. mexicana* *A. microphylla* ใน section *Azolla* ซึ่งทั้งสามสายพันธุ์นี้มีลักษณะโครงสร้างของ vegetative คล้ายคลึงกัน แต่ใน section *Rhizosperma* ลักษณะทาง vegetative จะแตกต่างจากสายพันธุ์อื่นๆอย่างชัดเจนจึงง่ายในการจำแนกสายพันธุ์ แต่สปอร์เพศเมียมีขนาดเล็กมากยากต่อการสังเกตจำนวนฟลูท (float) ได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งการแก้ปัญหาเกี่ยวกับการจำแนกด้วยวิธีทำให้มีการศึกษาการจำแนกโดยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอซึ่งทำการศึกษาในการทดลองต่อไป

3.2 การจำแนกสายพันธุ์เหินแดงโดยการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ

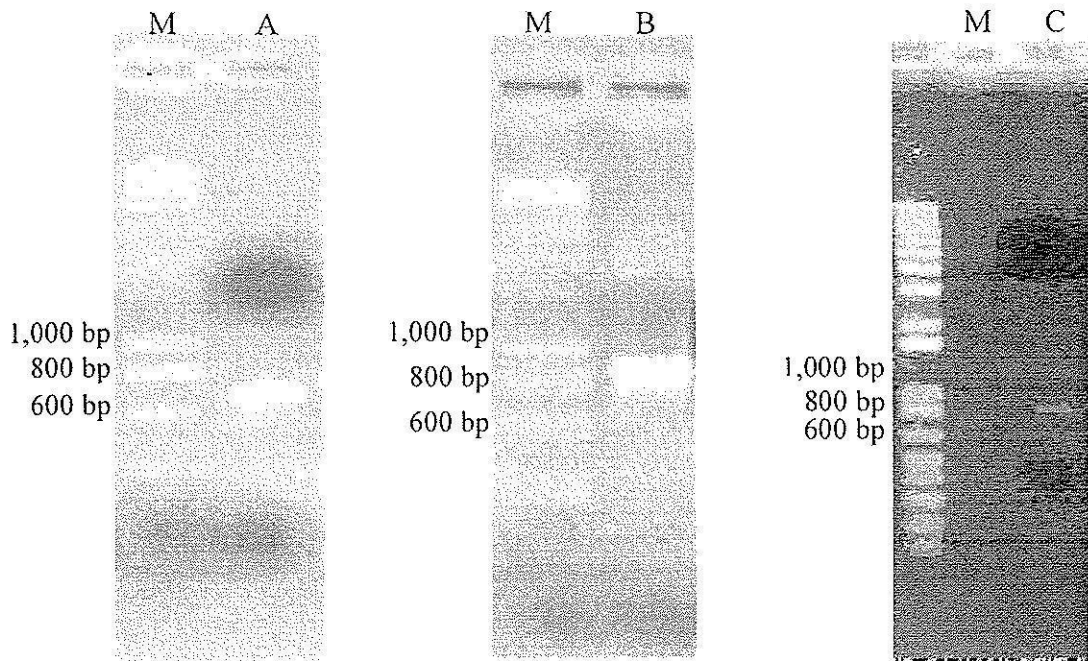
3.2.1 วิเคราะห์พันธุกรรม

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากรากของเหินแดงตามวิธีของ Dellaporta และคณะ (1983) โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้จะนำมาใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ลำดับเบสช่วง NS1-NS2 region ซึ่งเป็น conserve region และใช้ลำดับเบสช่วง ITS1-ITS4 region ซึ่งเป็น variable region เป็นไพรเมอร์ (primer) ผลของการใช้ไพรเมอร์ NS1-NS2 (เป็นส่วนหนึ่งใน 18S rDNA) พบว่า PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 600 bp (รูปที่ 3.11)



รูปที่ 3.11 แถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ของเหินแดงแต่ละสายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ NS เลน M= ดีเอ็นเอเครื่องหมาย (HyperLadder marker) เลน1 = แถบดีเอ็นเอสายพันธุ์ AZO3 เลน2 = แถบดีเอ็นเอสายพันธุ์ AZO1 และ เลน3 = แถบดีเอ็นเอสายพันธุ์ AZO2

สำหรับสายพันธุ์ແໜແຈງທີ່จำแนกโดยใช้ ITS region โดย Genomic DNA ที่สกัดได้จากรากແໜແຈງเมื่อนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ ITS1-ITS4 ซึ่งเป็น universal primer (White และคณะ 1990) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ได้มาจากรายงานซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้กับยูคาริโอตชนิดอื่นๆ PCR product ที่ได้มีขนาดลำดับเบสประมาณ 700, 900 และ 800 bp สำหรับสายพันธุ์ AZO1, AZO3 และ AZO2 (รูปที่ 3.12)



รูปที่ 3.12 แอปลิเอนเอนอะกาโลสเจสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ของແໜແຈງแต่ละสายพันธุ์ A= สายพันธุ์ AZO1 B=สายพันธุ์ AZO3 C=สายพันธุ์ AZO2

3.2.2 วิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ

นำลำดับเบสบางส่วนที่ได้จากการใช้ 18S rDNA region ของແໜແຈງแต่ละสายพันธุ์มาวิเคราะห์หาลำดับเบสของดีเอ็นเอแล้วนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสของແໜແຈງแต่ละสายพันธุ์ใน Genbank เมื่อใช้การวิเคราะห์ความใกล้เคียงกันของลำดับเบสโดยใช้ BLAST พบว่าลำดับเบสของ AZO1 AZO2 และ AZO3 มีความใกล้เคียงกับແໜແຈງสายพันธุ์ *Azolla* sp. Qui 02051 (Accession no. DQ629421) สายพันธุ์ *A. filiculoides* (Accession no. AY612717) และสายพันธุ์ *A. filiculoides* (Accession no. AY612717) ตามลำดับ (รูปที่ 3.13-3.15)

DQ629421; *Azolla* sp. Qiu 02051 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Length=1582
 Score = 893 bits (990), Expect = 0.0
 Identities = 507/511 (99.2%), Gaps = 3/511 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

AZ01 16 AACACTTTTGT-CTGTGAA-CTGCGAATGGCTCATTAATCAGTTATAGTTTCTTTGATG 73
      ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1 AACTCTTTTGTACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAATCAGTTATAGTTTCTTTGATG 60

AZ01 74 GTACCTTGCTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCACCAACTCCCGA 133
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 51 GTACCTTGCTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCACCAACTCCCGA 120

AZ01 134 CTTCTGGAAGGGACGCATTTATTAGATAAAAGGCCGATGCGGGCTTGCCCGGTATTGCGG 193
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 121 CTTCTGGAAGGGACGCATTTATTAGATAAAAGGCCGATGCGGGCTTGCCCGGTATTGCGG 180

AZ01 194 TGAATCATGATAACTTCCCGAATCGCACGGCCTTTGCGCCGGCGATGCTTCATTCAAATT 253
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 181 TGAATCATGATAACTTCCCGAATCGCACGGCCTTTGCGCCGGCGATGCTTCATTCAAATT 240

AZ01 254 TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTGACGGGTGACGG 313
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 241 TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTGACGGGTGACGG 300

AZ01 314 AGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGG 373
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 301 AGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGG 360

AZ01 374 CAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATA 433
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 361 CAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATA 420

AZ01 434 CTGGGCTTTTACAAGTCCGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATC 493
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 421 CTGGGCTTTTACAAGTCCGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATC 480

AZ01 494 CATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCNCAGCAGCC 524
      ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 481 CATTGGAGGGCAAGTCTGGTGC-CAGCAGCC 510
  
```

รูปที่ 3.13 ลำดับเบสของสายพันธุ์ AZO1 ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank library โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)
 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

DQ066481; *Azolla microphylla* voucher Reid & Peters 77 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Length=827 Score = 1598 bits (806), Expect = 0.0 Identities = 819/824 (99.3%), Gaps = 0/824 (0%) Strand=Plus/Minus

```

AZ01 11 CGCCTGATCTGAGGTCCGTTTGATAGTTTCGGTCTAGGCAACACCTAGAACGATTAGCCC 70
      |||
Sbjct 824 CGCCTGATCTGAGGTCCGTTTGATAGTTTCGGTCTAGGCAACACCTAGAACGATTAGCCC 765

AZ01 71 GACTCGATAGAAGCATCCTTAAACGGGAAACACGTCGCAACAGTTGCAATCTCGGAGCCT 130
      |||
Sbjct 764 GACTCGATAGATGCATCCTTAAACGGGAAACACGTCGCAACAGTTGCAATCTCGGAGCCT 705

AZ01 131 TGATGGGCTACGGAAGCAAACCACCTTGCACGCATCGCCACACGGAGCAATCGATGCA 190
      |||
Sbjct 704 TGATGGGCTACGGAAGCAAACCACCTTGCACGCATCGCCACACGGAGCAATCGATGCA 645

AZ01 191 TTTCAGCCGACCGCTAGTGCCAAATACTCACATCATGTGCAAGAAAGGCTCCAACGGACA 250
      |||
Sbjct 644 TTTCAGCCGACCGCTAGTGCCAAATACTCACATCATGTGCAAGAAAGGCTCCAACGGACA 585

AZ01 251 ACCATCTCCGCCACTCCATCACACCAAATGGTGGGGGAGTGGCGTGGGGGTCTGTAGGAC 310
      |||
Sbjct 584 ACCATCTCCGCCACTCCATCACACCAAATGGTGGGGGAGTGGCGTGGGGGTCTGTAGGAC 525

AZ01 311 GCTCAGGCAGACGTGCCCTTGACAAAGCCTCGGGCGCAAGTTGCGTTCAAAGACTCGATG 370
      |||
Sbjct 524 GCTCAGGCAGACGTGCCCTTGACAAAGCCTCGGGCGCAAGTTGCGTTCAAAGACTCGATG 465

AZ01 371 ATTCGCGGAATTCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGTTGC 430
      |||
Sbjct 464 ATTCGCGGAATTCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGTTGC 405

AZ01 431 AAGAGCCAAGATATCCGTTGCTGAGAGTCGTTTGTGATTGTATATCCTCCATAAGGAGG 490
      |||
Sbjct 404 AAGAGCCAAGATATCCGTTGCTGAGAGTCGTTTGTGATTGTATATCCTCCATAGGGAGG 345
AZ01 491 GCGTCTCAGTCAATAAGTTTTATGGGTTGCCTCCCGTCCCTCCGTACCCACGAGGGGG 550
      |||
Sbjct 344 GCGTCTCAGTCAATAAGTTTTATGGGTTGCCTCCCACTCCCTCCGTACCCACTAGGGGG 285

AZ01 551 GTTAGGAGGGGCAAGAGATGGTTTGACATAGCGGCCCGTGCCAATACGACACGGAGGAG 610
      |||
Sbjct 284 GTTAGGAGGGGCAAGAGATGGTTTGACATAGCGGCCCGTGCCAATACGACACGGAGGAG 225

AZ01 611 GGGGGTCGACCGCAGATCCGCACAATGAGAAGCGTCCCTCTCATCGTCATATCGCACT 670
      |||
Sbjct 224 GGGGGTCGACCGCAGATCCGCACAATGASAAGCGTCCCTCTCATCGTCATATCGCACT 165

AZ01 671 CTCGGTGGGACAACCCCTACAACCCACACAAGACCCACAACGTGCCCGCATCTGGCACA 730
      |||
Sbjct 164 CTCGGTGGGACAACCCCTACAACCCACACAAGACCCACAACGTGCCCGCATCTGGCACA 105

AZ01 731 GGAGTCGAGCGGGGCGGACACGCCTCCGAGCGCGTCGCTCAAATAACAAGCACGGTTCG 790
      |||
Sbjct 104 GGAGTCGAGCGGGGCGGACACGCCTCCGAGCGCGTCGCTCAAATAACAAGCACGGTTCG 45

AZ01 791 CGTGGTTGGTTTGGATGTGTGTCATGATCCTTCCGCAGGTTCA 834
      |||
Sbjct 44 CGTGGTTGGTTTGGATGTGTGTCATGATCCTTCCGCAGGTTCA 1

```

รูปที่ 3.16 ลำดับเบสของสายพันธุ์ AZO1 ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank library โดย

ใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

DQ066479; *Azolla mexicana* voucher Reid & Peters 69 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Length=827 Score = 1418 bits (1572), Expect = 0.0 Identities = 801/809 (99.0%), Gaps = 3/809 (0%) Strand=Plus/Minus

```

AZO2 19 AGGTC-GTTTGA-AGTTTCGGTCTAGGCAACACCTAGAACGATTAGCCCGACTCGATAGA 76
      ||||| ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 813 AGGTCGGTTTGATAGTTTCGGTCTAGGCAACACCTAGAACGATTAGCCCGACTCGATAGA 754

AZO2 77 AGCATCCTTAAACGGGAAACACGTCGCAACAGTTGCAATCTCGGAGCCTTGATGGGCTAC 136
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 753 AGCATCCTTAAACGGGAAACACGTCGCAACAGTTGCAATCTCGGAGCCTTGATGGGCTAC 694

AZO2 137 GGAAGCAAACCACCCTTGCAGCGCATCGCCACACGGAGCAATCGATGCATTTAGCCGAC 196
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 693 GGAAGCAAACCACCCTTGCAGCGCATCGCCACACGGAGCAATCGATGCATTTAGCCGAC 634

AZO2 197 CGCTAGTGCCAAATACTCACATCATGTGCAAGAAAGGCTCCAACGGACAACCATCTCCGC 256
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 633 CGCTAGTGCCAAATACTCWCATCATGTGCAAGAAAGGCTCCAACGGACAACCATCTCCGC 574

AZO2 257 CACTCCATCACACCAAATGGTGGGGGAGTGGCGTGGGGGTCGTGAGGACGCTCAGGCAGA 316
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 573 CACTCCATCACACCAAATGGTGGGGGAGTGGCGTGGGGGTCGTGAGGACGCTCAGGCAGA 514

AZO2 317 CGTGCCCTTGGACAAGCCTCGGGCGCAAGTTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCGCGGAAT 376
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 513 CGTGCCCTTGGACAAGCCTCGGGCGCAAGTTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCGCGGAAT 454

AZO2 377 TCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTCGCTGCGTTCATCGTTGCAAGAGCCAAGA 436
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 453 TCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTCGCTGCGTTCATCGTTGCAAGAGCCAAGA 394

AZO2 437 TATCCGTTGCTGAGAGTCGTTTGTGATTGTATATCCTCCATAAAGAGGGCGTCTCAGTC 496
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 393 TATCCGTTGCTGAGAGTCGTTTGTGATTGTATATCCTCCATAAAGAGGGCGTCTCAGTC 334

AZO2 497 AATAAGTTTTATGGGTGCGCTCCCGCTCCCTCCGTACCCACCAGGGGGTTAGGAGGGG 556
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 333 AATAAGTTTTATGGGTGCGCTCCCGCTCCCTCCGTACCCACCAGGGGGTTAGGAGGGG 274

AZO2 557 CAAGAGATGGTTTGACATAGCGGCCCGTGCCAATACGACACGGAGGAGGGGGTTCGACC 616
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 273 CAAGAGATGGTTTGACATAGCGGCCCGTGCCAATACGACACGGAGGAGGGGGTTCGACC 214

AZO2 617 GCACGATCCGCACAATGAGAAGCGTCCCTTCATCGTGCATATCGCACTCTCGGTGGGAC 676
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 213 GCACGATCCGCACAATGASAAGCGTCCCTTCATCGTGCATATCGCACTCTCGGTGGGAC 154

AZO2 677 AACCCCTACAACCCACACAAGACCCACAACGTGCCCCGCATCTGGCACAGGAGTCGAGCG 736
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 153 AACCCCTACAACCCACACAAGACCCACAACGTGCCCCGCATCTGGCACAGGAGTCGAGCG 94

AZO2 737 GGGCGGACACGCCTCCGAGCGCGTCGCCTCAAATACAAGCACAGTTCGCGTGGTTGGTT 796
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 93 GGGCGGACACGCCTCCGAGCGCGTCGCCTCAAATACAAGCACAGTTCGCGTGGTTGGTT 34

AZO2 797 TGGATGTGTGTCATGATCCTTCCCGCAG 825
      ||||||||||||||||||||||||
Sbjct 33 TGGATGTGTGTCATGATCCTT-CCGCAG 6

```

รูปที่ 3.17 ลำดับเบสของสายพันธุ์ AZO2 ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank library โดย

ใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

DQ066494; *Azolla filiculoides* voucher Reid & Peters 68 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Length=841, Score= 1542 bits(778), Expect= 0.0 Identities 794/800(99.2%), Gaps= 0/800 (0%), Strand= Plus/Plus

```

AZ03 23  ACGCGAACCTTGCTTGTATTTTGAGGCGACGCGCTCGGAGGCGTGTCCGCCCGCTTGAC 82
      |
Sbjct 42  ACGCGAACCTTGCTTGTATTTTGAGGCGACGCGCTCGGAGGCGTGTCCGCCCGCTTGAC 101

AZ03 83  TCCTGTGCTAGATCCGGGGCACGTCGTGGGTCATGTGTGGGTGTAGGGGTTGTCCCACC 142
      |
Sbjct 102 TCCTGTGCTAGATCCGGGGCACGTCGTGGGTCATGTGTGGGTGTAGGGGTTGTCCCACC 161

AZ03 143  GAGAGTGCATATGTATGATGACAGGGACGCTGTCTTTGTGCGCATCGTGCGGTCGACC 202
      |
Sbjct 162  GAGAGTGCATATGTATGATGACAGGGACGCTGTCTTTGTGCGCATCGTGCGGTCGACC 221

AZ03 203  CCCCTCCTCCGTGTCGTATCGGCACGGGGCCGCTATGTCAAACCATCTCTTGCCCTCCT 262
      |
Sbjct 222  CCCCTCCTCCGTGTCGTATCGGCACGGGGCCGCTATGTCAAACCATCTCTTGCCCTCCT 281

AZ03 263  AACCCCTCCTCGTGGGGTAAGGAGGGAGCGGGAGGCAACCCATAAACGCATTGACTGAGAC 322
      |
Sbjct 282  AACCCCTCCTCGTGGGGTAAGGAGGGAGCGGGAGGCAACCCATAAACGCATTGACTGAGAC 341

AZ03 323  GCCCTCCCTATGGGAGGATACATATTAACAAACGACTCTCACCAACGGATATCTTGCTC 382
      |
Sbjct 342  GCCCTCCCTATGGGAGGATACATATTAACAAACGACTCTCAGCAACGGATATCTTGCTC 401

AZ03 383  TTGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGCGA 442
      |
Sbjct 402  TTGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGCGA 461

AZ03 443  ATCATCTAGTCTTTGAACGCAACTTGCGCCCGAGGCTTGTCGAAGGGCACGCTGCCTGA 502
      |
Sbjct 462  ATCATCTAGTCTTTGAACGCAACTTGCGCCCGAGGCTTGTCGAAGGGCACGCTGCCTGA 521

AZ03 503  GCGTCCTCACGACCCCCACGCGCTCCCCCTCCACTCGGTGGGATGGAGTATCGGAGATG 562
      |
Sbjct 522  GCGTCCTCACGACCCCCACGCGCTCCCCCTCCACTCGGTGGGATGGAGTATCGGAGATG 581

AZ03 563  GTTGTCCGTTGGAGCCCTTCTAGCGGCTCTAGCGGTCGGCTGAAATGCATCGATTGCTCC 622
      |
Sbjct 582  GTTGTCCGTTGGAGCCCTTCTAGCGGCTCTAGCGGTCGGCTGAAATGCATCGATTGCTCC 641

AZ03 623  GTGTGGCGATGCGTCGCAAGGGTGGTTTGTCTCCTCGGCCCGCAAGGGATCCGAGATCGC 682
      |
Sbjct 642  GTGTGGCGATGCGTCGCAAGGGTGGTTTGTCTCCTCGGCCCGCAAGGGATCCGAGATCGC 701

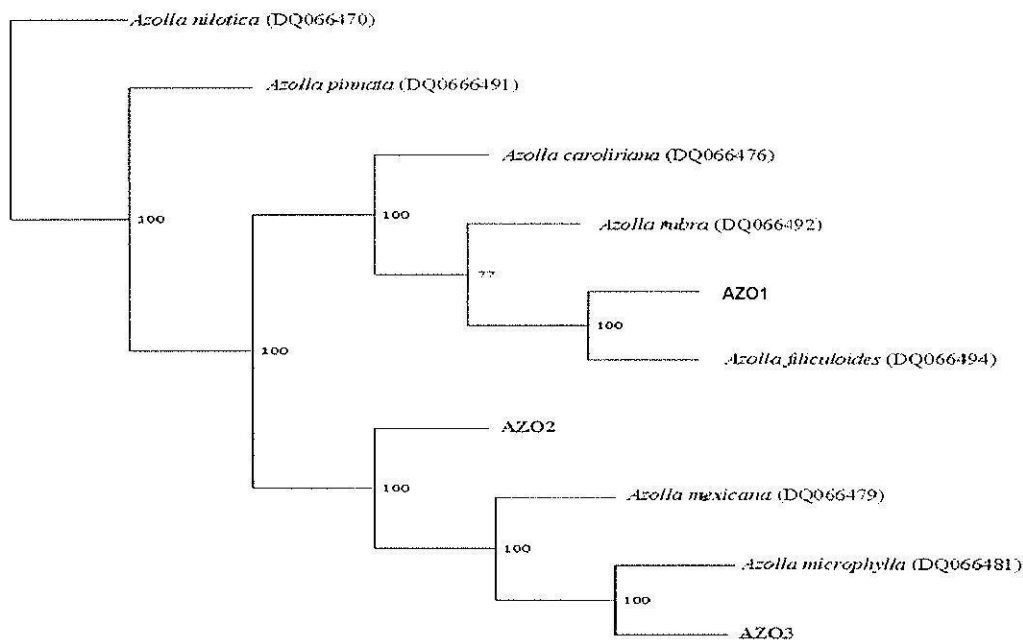
AZ03 683  AACTGTTGCGGCGTGTACCCGATCAAGGATGCTTATATCGAGTCCGGCTAATCGATCTG 742
      |
Sbjct 702  AACTGTTGCGGCGTGTACCCGATCAAGGATGCTTATATCGAGTCCGGCTAATCGATCTG 761

AZ03 743  GGCATTACGTCCATTTGCTTCGTGCAGTTTGGCGTTATGCGTAGACCGAAACCATCGAAC 802
      |
Sbjct 762  GGCATTACGTCCATTTGCTTCGTGCAGTTTGGCGTTATGCGTAGACCGAAACCATCGAAC 821

AZ03 803  GGACCTCACATCAGGCGAGA 822
      |
Sbjct 822  GGACCTCAGATCAGGCGAGA 841

```

รูปที่ 3.18 ลำดับเบสของสายพันธุ์ AZO3 ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank library โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)



รูปที่ 3.19 ความสัมพันธ์ในระดับโมเลกุล (phylogenetic relationship) ของແຫນແຕງແຕ່ລະสายพันธุ์

จากการหาลำดับเบสของແຫນແຕງทั้ง 3 สายพันธุ์ (AZO1 AZO2 และ AZO3) โดยใช้ไพรเมอร์ NS1-NS2 ซึ่งสังเคราะห์มาจากบางส่วนของ 18S rDNA พบว่าลำดับเบสที่ได้มีความสอดคล้องกับແຫນແຕງสายพันธุ์เดียวคือ *A. filiculoides* ซึ่งเกือบทุกสายพันธุ์ให้ค่าความคล้ายคลึงกันกับฐานข้อมูลใน GenBank 99 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เมื่อใช้ไพรเมอร์ ITS ผลจากการเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลสอดคล้องกับແຫນແຕງ 3 สายพันธุ์คือ *A. microphylla*, *A. mexicana* และ *A. filiculoides*. ให้ค่าความคล้ายคลึงกันกับฐานข้อมูลใน GenBank 99.3, 99.0 และ 99.2% ตามลำดับ (ตารางที่ 3.1) ซึ่งจากผลการทดลองนี้กล่าวได้ว่าการหาลำดับเบสโดยใช้ ITS region มีประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์ของແຫນແຕງได้จำเพาะเจาะจงกว่าการใช้ 18S rDNA เนื่องจากในปัจจุบันมักมีการนำ ITS region มาใช้ประโยชน์ในทางระบบโมเลกุลซึ่งนำมาใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิตในระดับสปีชีส์เพราะ ITS region มีค่าความแปรปรวน (degree of variation) สูงกว่า rDNA region

ตารางที่ 3.1 ผลวิเคราะห์ความใกล้เคียงกันของลำดับเบสในແແແແแต่ละสายพันธุ์โดยใช้ 18SrRNA และ Internal transcribe spacer of nuclear ribosomal RNA (rRNA)

สายพันธุ์	Primer	% homology	Closest organism	Accession no.
AZO1	18SrRNA	99.2	<i>Azolla</i> sp. Qiu 02051	DQ629421
AZO2		99.6	<i>Azolla filiculoides</i>	AY612717
AZO3		99.4	<i>Azolla filiculoides</i>	AY612717
AZO1	ITS	99.3	<i>Azolla microphylla</i>	DQ066481
AZO2		99.0	<i>Azolla mexicana</i>	DQ066479
AZO3		99.2	<i>Azolla filiculoides</i>	DQ066494

3.2.3 การเปรียบเทียบวิธีการจำแนกสายพันธุ์ແແແแโดยใช่วิธีการวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอกับวิธีการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา

ในการจำแนกແແแเมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากรากແแเพิ่มปริมาณและหาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้ universal primer (NS1-NS2) พบว่าสายพันธุ์ AZO1 (คล้ายคลึงกับ *Azolla* sp. Qiu 02051 99.2%) AZO2 (คล้ายคลึงกับ *A. filiculoides* 99.6%) และ AZO3 (คล้ายคลึงกับ *A. filiculoides* 99.4%) ในขณะที่ผลจากการเพิ่มปริมาณและหาลำดับเบสเมื่อใช้ ITS region ซึ่งให้เห็นว่า AZO1 (คล้ายคลึงกับ *A. microphylla* 99.3%) AZO2 (คล้ายคลึงกับ *A. mexicana* 99.0%) และ AZO3 (คล้ายคลึงกับ *A. filiculoides* 99.2%) ซึ่งในส่วนของการจำแนกสายพันธุ์ແแโดยการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาจำแนกได้ว่า AZO1 คือสายพันธุ์ *A. microphylla* AZO2 คือสายพันธุ์ *A. cristata* (เรียกรวมกันระหว่าง 3 สายพันธุ์ *A. caroliniana* *A. microphylla* และ *A. mexicana* เพราะมีลักษณะคล้ายกันจึงไม่สามารถจำแนกกันอย่างชัดเจนได้) และ AZO3 คือสายพันธุ์ *A. filiculoides*

ผลจากการเปรียบเทียบวิธีที่ใช้ในการจำแนกทั้ง 2 วิธีสรุปในตารางที่ 3.2 โดยผลจากการจำแนกด้วยวิธีการวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอโดยใช้ ITS region พบว่าในสายพันธุ์ AZO2 ให้ผลความแม่นยำในการจำแนกได้ดีกว่าการจำแนกโดยการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาเนื่องจาก ITS มีค่าความแปรปรวน (degree of variation) สูงกว่า rDNA region (SSU) ผลของการจำแนกสายพันธุ์ของແแโดยใช่วิธีการศึกษาลักษณะทางโมเลกุลสามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจนโดยสายพันธุ์ที่จำแนกได้จากการศึกษาครั้งนี้คือ *A. microphylla* *A. mexicana* และ *A. filiculoides*

ตารางที่ 3.2 สรุปวิธีการจำแนกลำดับดีเอ็นเอของเหินแดงและวิธีการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของเหินแดงแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์	ลักษณะทางสรีรวิทยา	การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ	
		18S rDNA	ITS region
AZO1	<i>A. microphylla</i>	<i>Azolla</i> sp. Qiu 02051	<i>A. microphylla</i>
AZO2	<i>A. cristata</i>	<i>A. microphylla</i>	<i>A. mexicana</i>
AZO3	<i>A. filiculoides</i>	<i>A. filiculoides</i>	<i>A. filiculoides</i>

3.3 ผลการวิเคราะห์ดิน

จากผลการวิเคราะห์ดินทั้งก่อนและหลังการใช้เหินแดงพบว่า หลังจากการใช้เหินแดงแล้วพบว่าค่าอินทรีย์วัตถุ ไนโตรเจนทั้งหมด และค่าโพแทสเซียมในดินเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในด้านการทดลองส่วนใหญ่ โดยพบว่าในด้านการทดลองที่ 2 ให้ค่าอินทรีย์วัตถุสูงสุดที่สุดคือ 1.39% เมื่อเปรียบเทียบค่าวิเคราะห์ทั้งก่อนและหลังการใช้เหินแดงพบว่าในแต่ละด้านการทดลองให้ค่าที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งค่าอินทรีย์วัตถุและค่าไนโตรเจนที่ลดลงหลังจากการใช้เหินแดงไปนั้น เนื่องมาจากว่าขี้วัวนำธาตุอาหารเหล่านี้ไปใช้ในการเจริญเติบโต ในทางกลับกันฟอสฟอรัสกลับมีค่าสูงขึ้นซึ่งคาดว่ามาจากธาตุฟอสฟอรัสที่จับตัวอยู่กับดินและปุ๋ยฟอสฟอรัสบางส่วนที่ตกค้างหลังจากการใช้เพื่อเลี้ยงเหินแดง

ตารางที่ 3.3 ผลการวิเคราะห์ดินในนาข้าวเมื่อใช้เหินแดงและปุ๋ยเคมีต่อปริมาณอินทรีย์วัตถุ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียมในดินทั้งก่อนและหลังการใช้

Treatment	pH		OM (%)		Total N (%)		Extr.P (ppm)		Exch.K (ppm)	
	initial	post	initial	post	initial	post	initial	post	initial	post
T1 (AZO1)	7.85	7.32	1.26	1.15	0.06	0.05	14	17	149	88
T2 (AZO2)		7.15		1.39		0.05		31		113
T3 (AZO3)		7.32		1.20		0.05		20		84
T4 (fertilizer)		6.90		1.09		0.04		17		79
T5 (No <i>Azolla</i>)		6.50		1.17		0.04		11		94

3.4 การใช้แผนแดงแต่ละสายพันธุ์เพื่อเป็นปุ๋ยชีวภาพในนาข้าว

การทดลองนี้ทำในช่วงเดือนสิงหาคม 2549 ถึงเดือนธันวาคม 2549 โดยใช้การทดลองแบบ RCBD โดยทำการทดลองแปลงละ 3 ซ้ำ ใช้แผนแดงเริ่มต้น 250 กรัม/ตร.ม ในพื้นที่แปลงละ 2 ม. X 4 ม. ใช้ข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยรักษาระดับน้ำในแต่ละแปลงให้เท่าๆกัน โดยประกอบไปด้วยดำรับการทดลองต่างๆดังนี้ 1) ปลูกร่วมกับแผนแดงสายพันธุ์ AZO1 2) ปลูกร่วมกับแผนแดงสายพันธุ์ AZO2 3) ปลูกร่วมกับแผนแดงสายพันธุ์ AZO3 4) ปลูกร่วมกับปุ๋ยเคมีสูตร 12-8-8 กก./ไร่ 5) ปลูกร่วมโดยไม่ใส่ทั้งแผนแดงและปุ๋ยเคมี โดยผลจากการสังเกตการเจริญเติบโต (ความสูง จำนวนต้นต่อกอ จำนวนเมล็ดเต็มต่อรวงและน้ำหนัก 100 เมล็ด) และผลผลิตทั้งหมดสรุปอยู่ในตารางที่ 3.4 และ 3.5 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.4 ผลของการใช้แผนแดงและปุ๋ยเคมีที่มีต่อการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ดำรับการทดลอง	ความสูง (ซม.)	จำนวนต้น/ กอ	จำนวนเมล็ดเต็ม/ รวง	น้ำหนัก 100 เมล็ด (กรัม)
T1 (AZO1)	106b	11.1a	239a	2.46b
T2 (AZO2)	101b	10.9a	240a	2.40a
T3 (AZO3)	96ab	11.2a	237a	2.34a
T4 (ปุ๋ยเคมี)	103b	11.1a	252a	2.46b
T5 (ไม่ใส่ปุ๋ยและแผนแดง)	81a	9.3a	217a	2.36a

ในดำรับการทดลองที่ 1 เมื่อใช้แผนแดงสายพันธุ์ AZO1 แสดงความสูงของต้นข้าวสูงที่สุดคือ 106 ซม. โดยในระหว่างดำรับการทดลองที่ใช้แผนแดงและที่ใช้ปุ๋ยเคมีพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติยกเว้นในดำรับการทดลองที่ไม่ใส่ปุ๋ยและแผนแดงซึ่งให้ค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับผลของจำนวนต้นต่อกอและจำนวนเมล็ดเต็มต่อรวงไม่พบค่าความแตกต่างในทุกๆดำรับการทดลอง โดยผลของน้ำหนัก 100 เมล็ดสูงสุดคือ ดำรับการที่ใช้แผนแดงสายพันธุ์ AZO1 และดำรับการทดลองที่ใช้ปุ๋ยเคมีซึ่งให้ผลคือ 2.46 กรัม/100 เมล็ด

ตารางที่ 3.5 ผลของการใช้หนวดต่อผลผลิตข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ดำรับการทดลอง	ผลผลิตข้าว (ตัน/เฮกเตอร์)	ผลผลิต (กก./ไร่)	% ผลผลิตที่เพิ่มขึ้น
T1 (AZO1)	4.97c	795.2c	16.72
T2 (AZO2)	4.49ab	718.4ab	7.92
T3 (AZO3)	4.15a	664.0a	0.29
T4 (ปุ๋ยเคมี)	4.72bc	755.2bc	12.28
T5 (ไม่ใส่ปุ๋ยและหนวด)	4.14a	662.4a	-

Number between common letter in each column showed no significance different at 95% DMRT.

ผลผลิตของข้าวขาวดอกมะลิ 105 พบว่ามีความแตกต่างกันในแต่ละดำรับการทดลอง (ตารางที่ 3.5) ผลผลิตจะอยู่ในช่วง 4.14 – 4.97 ตัน/เฮกเตอร์ ผลผลิตที่พบสูงที่สุดคือดำรับการทดลองที่ 1 (หนวดสายพันธุ์ AZO1) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับดำรับการทดลองที่ 4 (ปุ๋ยเคมี) ซึ่งให้ค่าผลผลิตที่สูงกว่าแปลงควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การใช้หนวดในดำรับการทดลองที่ 3 (หนวดสายพันธุ์ AZO3) กลับพบว่าผลผลิตไม่มีความแตกต่างกับแปลงควบคุม

เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่เพิ่มขึ้นในแต่ละดำรับการทดลองทำโดยการเปรียบเทียบกับผลผลิตในดำรับการทดลองที่ไม่ใส่ทั้งปุ๋ยเคมีและหนวด โดยเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่เพิ่มขึ้นนี้อยู่ในช่วงระหว่าง 16.72-0.29 % โดยในดำรับการทดลองเมื่อใช้หนวดสายพันธุ์ *A. microphylla* (ผลที่ได้จากการคัดแยกสายพันธุ์ AZO1 ในการทดลองที่แล้ว) ให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่เพิ่มขึ้น 16.72 % สูงกว่าในดำรับการทดลองที่ใช้ปุ๋ยเคมี (12.28%) จากการทดลองนี้พบว่าหนวด (โดยเฉพาะสายพันธุ์ *A. microphylla*) เป็นปุ๋ยธรรมชาติที่ดีที่สุดในการนำข้าว โดยให้ผลผลิตข้าวเทียบเท่ากับการใช้ปุ๋ยเคมี ดังการทดลองในจังหวัด Kwangtong ของ Lui Xi lian และคณะ (1981) ที่ทำการทดลองใช้หนวด 25,000 – 37,000 กก./ เฮกเตอร์ ซึ่งได้ผลผลิตข้าวอยู่ที่ 587-795 กก. มากกว่าการทดลองที่ไม่ใช้หนวดร่วมด้วยซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่เพิ่มขึ้น 9.6-13.0%

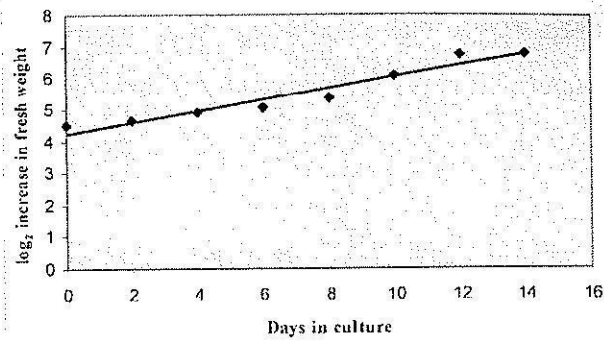
ในพื้นที่อื่นๆที่มีการใช้หนวดเช่น อียิปต์ โดยตั้งแต่ปีค.ศ. 1977 – 1980 นักจุลชีววิทยาทางดินของ Agricultural Research Centre ได้แนะนำให้ใช้หนวด 3 สายพันธุ์ คือ *A. pinnata*, *A. caroliniana* และ *A. filiculoides* เพื่อเป็นปุ๋ยพืชสดในนาข้าว (Yanni et al., 1994) โดยใช้วิธีใส่หนวด 2 วิธีคือ วิธีแรกทำการเพาะเลี้ยงหนวดในนาข้าวประมาณ 2-3 สัปดาห์แล้วทำการไถกลบก่อนทำการปลูกข้าวประมาณ 2 สัปดาห์ หรืออีกวิธีคือทำการเลี้ยงหนวดในระหว่างทำการปลูกข้าวโดยเลี้ยงหนวดในสัปดาห์แรกหลังจากเริ่มปลูกข้าว ปล่อยให้หนวดเจริญเติบโตในแปลง ทำการไถกลบหลังจากน้ำทำการระบายน้ำออก จากสภาพแวดล้อมและภูมิอากาศในอียิปต์พบว่าการใช้วิธีที่ 2 เหมาะสมกับการใช้มากกว่าวิธีแรก (Yanni et al., 1994) จากผลการทดลองเมื่อทำการไถกลบหนวด

แดงลงแปลงในตลอดระยะเวลาเจริญเติบโตของปลูกข้าว นักวิจัยพบว่าการใช้วิธีนี้ช่วยลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมีในโตรเจน (ยูเรีย) และช่วยลดผลของไนเตรทและไนไตรท์ไอออนในแหล่งน้ำด้วย (Yanni et al., 1994)

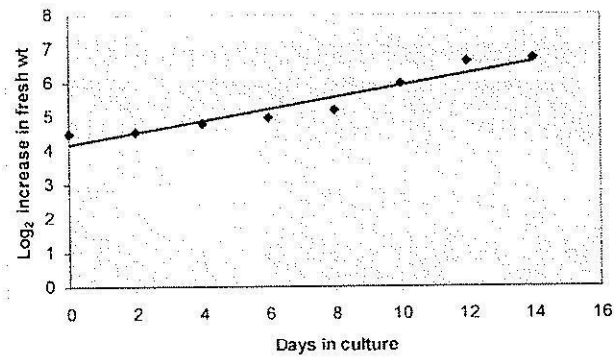
จากผลการทดลองของ Gevrek (2000) แสดงผลของแทนแดงสายพันธุ์ *A. mexicana* ร่วมกับการใช้ปุ๋ยเคมี (inorganic fertilizer) ในนาข้าวพื้นที่แถบอีเจียน (Aegean) พบว่าผลผลิตข้าวสายพันธุ์ Toag92 ให้ผลผลิตสูงที่สุดคือ 4.4 ตัน/ เฮกเตอร์ ซึ่งสรุปได้ว่าการใช้แทนแดงน้ำหนักสด 200 กรัม/ตร.ม ในนาข้าวช่วยประหยัดการใช้ปุ๋ยไป 1/3 เท่า จากการทดลองของ Hossain และคณะ (2001) เปรียบเทียบผลของการใช้ปุ๋ยไนโตรเจน (80 กก.ไนโตรเจน/ เฮกเตอร์) ร่วมกับการไถกลบแทนแดงร่วมกับปุ๋ยไนโตรเจน 40 กก.ไนโตรเจน/ เฮกเตอร์ในข้าว BR 26 พบว่าผลผลิตเมล็ดข้าวสูงสุดคือ 3.95 ตัน/ เฮกเตอร์ รวมถึงค่าน้ำหนักแห้ง (เมล็ด + ฟางข้าว) สูงที่สุดในชุดการทดลองที่ทำการไถกลบแทนแดง (เพาะเลี้ยงโดยใช้แทนแดงเริ่มต้น 0.2 กก/ ตร.ม)

3.5 การศึกษาการเจริญเติบโตของแทนแดง

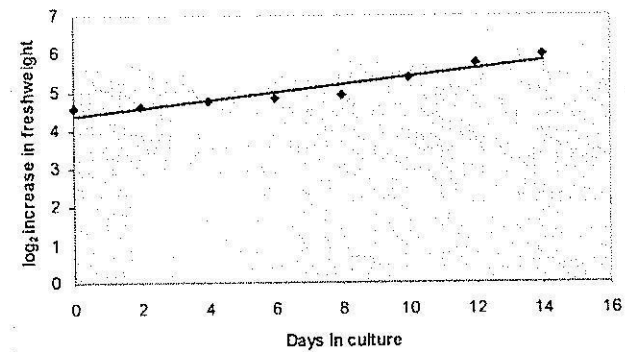
ทำการทดสอบหาน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของแทนแดง (Acetylene Reduction Activity : ARA) เวลาที่ใช้ในการขยายจำนวนเป็นเท่าตัว (doubling time) และผลผลิตไนโตรเจนโดยจะทำการทดสอบโดยใช้แทนแดงที่อายุ 21 วัน ผลการทดลองสรุปในตารางที่ 4.6 จากผลการทดลองพบว่าในน้ำหนักสดมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสายพันธุ์ AZO1 และ AZO2 ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างในสายพันธุ์ AZO3 โดยน้ำหนักที่พบสูงที่สุดคือ สายพันธุ์ AZO 1,174 กรัม/ ตร.ม สำหรับผลของน้ำหนักแห้งที่มีค่าสูงที่สุดคือ สายพันธุ์ AZO1 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสายพันธุ์อื่นๆ ส่วนค่า doubling time ไม่พบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ AZO1 และ AZO2 ในขณะที่สายพันธุ์ AZO3 พบว่ามีชีวมวลต่ำที่สุดและใช้เวลาในการเจริญเติบโตนานที่สุด (รูปที่ 3.20) โดยในสายพันธุ์ AZO1 มีค่า doubling time 3.8 วันในสภาพแปลง จากการทดลองของ Gopalaswamy และ Kannaiyan (1998) รายงานว่าแทนแดงสายพันธุ์ *A. microphylla* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร IRRI ใช้เวลาในการเจริญเติบโตเป็นครึ่งหนึ่ง (doubling time) 5.8 วันจากที่ทำการเลี้ยงเป็นเวลาทั้งหมด 14 วัน



(a)



(b)



(c)

รูปที่ 3.20 การเจริญเติบโตของเห็ดแดงสายพันธุ์ AZO1 (a), AZO2 (b) and AZO3 (c) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร N-free medium โดยทำการเลี้ยงในสภาพให้แสงและอุณหภูมิในสภาพสิ่งแวดล้อมทั่วไป

ผลจากตารางที่ 3.6 แสดงให้เห็นว่าไม่พบความแตกต่างของค่าประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน (ARA) ของແຫນແຕງໃນແຕ່ລະสายพันธุ์ โดยค่า ARA ที่พบสูงที่สุดคือ 13.58 $\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{น้ำหนักแห้ง (กรัม)/ ชม.}$ ในสายพันธุ์ AZO2 ส่วนสายพันธุ์ที่มีค่า ARA ต่ำที่สุดคือ AZO3 ส่วนการวิเคราะห์ค่าไนโตรเจนทั้งหมดของແຫນແຕງมีค่าอยู่ในช่วง 2.94 - 3.62 % จากผลการวิเคราะห์พบว่าในสายพันธุ์ AZO1 มีค่าไนโตรเจนทั้งหมดสูงที่สุด ตามด้วยสายพันธุ์ AZO3 และ AZO2 ตามลำดับ ซึ่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยหลักที่ช่วยเพิ่มผลผลิตในนาข้าว (Lui Chung-chu, 1979) ปริมาณไนโตรเจนในແຫນແຕງโดยปกติจะมีค่าประมาณ 0.25% (ขึ้นอยู่กับชนิดสายพันธุ์ สภาพภูมิอากาศ และเทคนิควิธีการเพาะเลี้ยง)

ตารางที่ 3.6 น้ำหนักสด, น้ำหนักแห้ง, ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน, อัตราการเจริญเติบโต และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของແຫນແຕງแต่ละสายพันธุ์ในนาข้าว

สายพันธุ์	น้ำหนักสด (กรัม/ ตร.ม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม/ ตร.ม)	ค่า doubling time (วัน)	ARA $\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{g dw/h}$	%ไนโตรเจนทั้งหมด
AZO1	1774b	98.66b	3.8a	13.12a	3.62b
AZO2	1568b	89.74a	3.9a	13.58a	2.94a
AZO3	633a	80.80a	6.6b	11.26a	3.26ab

Same letter in the same column showed no significance different at 95% DMRT

ความร้อนและแมลงศัตรูพืชเป็นปัจจัยที่ทำให้ชีวมวลของແຫນແຕງสายพันธุ์ AZO3 ต่ำและมีค่า doubling time สูง ซึ่งແຫນແຕງแต่ละสายพันธุ์มีระดับความทนทานต่ออุณหภูมิแตกต่างกันจึงจะเห็นได้จากการที่ແຫນແຕງมีชีวิตรอดในช่วงอุณหภูมิที่ค่อนข้างกว้าง โดยสายพันธุ์ *A. filiculoides* ค่อนข้างทนต่ออุณหภูมิต่ำ ในขณะที่สายพันธุ์ *A. mexicana*, *A. microphylla* และ *A. caroliniana* เจริญได้ดีในอุณหภูมิที่สูงกว่า (Lumpkin and Plucknett, 1982) แมลงศัตรูพืช, หอย, ปูนา และหนอนผีเสื้อกลางคืน เป็นปัญหาหลักที่พบในการเลี้ยงແຫນແຕງ ในการควบคุมกำจัดปัญหาแมลงศัตรูพืชในการทดลองนี้จะใช้ฟูราดาน (carbofuran) ซึ่งเป็นสารปราบศัตรูพืชที่มีความเป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของແຫນແຕງน้อยที่สุด ส่วนหนอนผีเสื้อกลางคืนทำการกำจัดด้วย monocrotophos 56% W.P สเปรย์ลงบนแปลงແຫນແຕງทุกๆสัปดาห์

ผลจากการทดลองโดยให้ແຫນແຕງทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่า สายพันธุ์ AZO1 และ AZO2 เหมาะสมกับการนำมาปรับใช้กับพื้นที่ประเทศไทย จากการทดลองของ Boonkerd และคณะ (1986) แสดงผลของการคัดเลือกແຫນແຕງจากสภาพพื้นที่ต่างๆภายในประเทศไทย พบว่าการทดลองที่สถานีทดลองขอนแก่นพบว่าไม่มีความแตกต่างของเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโต (doubling time) และประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของແຫນແຕງ (ARA) แต่พบว่ามีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทั้งใน

มวลชีวภาพและค่า doubling time ในสถานีทดลองที่เชียงใหม่ นอกจากนี้จากงานวิจัยของ Choonlunchanon และคณะในปี 1988 พบว่าการใช้เหินแดงสายพันธุ์ *A. caroliniana* and *A. microphylla* มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อราและแมลงศัตรูพืชมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ *A. pinnata* นอกจากนี้งานวิจัยของ Lumpkin และ Bartholomew (1986) ยังกล่าวว่าเหินแดงสายพันธุ์ *A. microphylla* ต้านทานต่อการเข้าทำลายของแมลงและความร้อนสูงได้

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

การจำแนกสายพันธุ์เหินแดง (*Azolla*) จีนัส *Azollaceae* มีความซับซ้อนและมีการทดลองมาเป็นเวลานาน เนื่องจากการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเหินแดงส่วนใหญ่จะเน้นการจำแนกโดยใช้โครงสร้างทางการสืบพันธุ์ (reproductive structure) ซึ่งเป็นส่วนที่พบได้ยากในธรรมชาติและในบางสายพันธุ์ยังมีการศึกษาไม่ชัดเจน การทดลองนี้ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ของเหินแดงโดยศึกษาภายใต้กล้อง stereo microscope กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน และการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ ทำการคัดเลือกเหินแดงเบื้องต้นจากแหล่งน้ำ 2 แหล่งคือ ฟาร์มและสวนเกษตรอินทรีย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยทำการคัดเลือกเหินแดงเบื้องต้นได้ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ (AZO1, AZO2 และ AZO3) ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการทดลองนี้จะทำการศึกษาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใบ ลักษณะขนใบ (epidermal trichome) และจำนวนฟองลอย (float) ในสปอร์เพศเมีย (megaspore) โดยสามารถจำแนกสายพันธุ์ได้ดังนี้ AZO1 คือสายพันธุ์ *A. microphylla* AZO2 คือสายพันธุ์ *A. cristata* (เรียกรวมกันระหว่าง 3 สายพันธุ์ *A. caroliniana* *A. microphylla* และ *A. mexicana* เพราะมีลักษณะคล้ายกันจึงไม่สามารถจำแนกกันอย่างชัดเจนได้) และ AZO3 คือสายพันธุ์ *A. filiculoides* นอกจากนี้ยังทำการศึกษาการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ (ใช้ทั้ง 18S rDNA and ITS region) ผลจากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ (18S rDNA) พบว่าลำดับเบสของ AZO1 AZO2 และ AZO3 มีความใกล้เคียงกับเหินแดงสายพันธุ์ *Azolla* sp. Qui 02051 (Accession no. DQ629421) สายพันธุ์ *A. filiculoides* (Accession no. AY612717) และสายพันธุ์ *A. filiculoides* (Accession no. AY612717) ตามลำดับ ซึ่งไพรเมอร์ 18S rDNA ไม่สามารถใช้ในการจำแนกในระดับสปีชีส์ได้ ในขณะที่เมื่อใช้ไพรเมอร์ ITS ผลจากการเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลสอดคล้องกับเหินแดง 3 สายพันธุ์ดังนี้ AZO1 คือ *A. microphylla*, AZO2 คือ *A. mexicana* และ AZO3 คือ *A. filiculoides*. ให้ค่าความคล้ายคลึงกันกับฐานข้อมูลใน GenBank 99.3, 99.0 และ 99.2% ตามลำดับ จากผลการจำแนกสายพันธุ์เหินแดงทางสรีรวิทยาพบว่ามีความจำเป็นที่ต้องใช้วิธีการคัดแยกทางโมเลกุลซึ่งเป็นวิธีที่ใช้จำแนกสายพันธุ์ในระดับสปีชีส์ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ นอกจากนี้ในผลการทดลองที่ใช้เหินแดงเพื่อเป็นปุ๋ยในนาข้าว โดยเปรียบเทียบกับการใช้ปุ๋ยเคมี (12-8-8 กก./ไร่) ผลผลิตเมล็ดข้าวสูงที่สุดที่ได้คือ การใช้เหินแดงสายพันธุ์ AZO1 (*A. microphylla*) ซึ่งพบว่าไม่แตกต่างจากการใช้ปุ๋ยเคมี ผลผลิตที่ได้จาก AZO1 มีค่าผลผลิตที่เพิ่มสูงขึ้น 16.72% สูงกว่าการใช้ปุ๋ยเคมีที่ 12.28% ดังนั้นจากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่าสายพันธุ์ *A. microphylla* สามารถนำมาใช้เพื่อเป็นปุ๋ยชีวภาพที่ให้ผลใกล้เคียงกับการใช้ปุ๋ยเคมี

เอกสารอ้างอิง

- ประเสริฐ สองเมือง. 2543. การใช้ปุ๋ยอินทรีย์ในนาข้าว. กลุ่มงานวิจัยความอุดมสมบูรณ์ของดิน กอง
ปฐพีวิทยา. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>
- Baker, J.A., Entsch, B. and McKay, D.B. (2003) The cyanobiont in an *Azolla* fern is neither
Anabaena nor *Nostoc*. FEMS Micro. Letters 229: 43-47.
- Boonkerd, N., Swatdee, P. and Choonluchanon, S. (1986). Vegetative propagation; selection of
Azolla. In: Method to culture, maintain and propagate *Azolla* under tropical conditions.
49 pp.
- Carrapico, F. 2002. The *Azolla-Anabaena*-bacteria system as a natural microcosm. Proceeding of
SPIE. 4495: 261-265.
- Carrapico, F., Teixeira, G. and Diniz, M. A. 2002. *Azolla* as a biofertilizer in Africa: a challenge
for the future. In Biotechnology of Biofertilizer. Kannalyan, S. Ed. Narosa Publishing
House. New Delhi. pp. 277-292.
- Choonluchanon, S., Boonkerd, N. and Swatdee, P. (1988). Adaptation of exotic *Azolla* to tropical
environment of Thailand. Plant and Soil. 108: 67-70.
- Dellporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. (1983). A plant DNA minipreparation: Version II. Plant
Molecular Biology. 1: 19-21
- Dunham, D.G. and Fowler, K. (1987). Taxonomy and species recognition in *Azolla* Lam. In:
Azolla utilization. International Rice Research Institute. Philippines. pp. 7-16.
- Felstein, J. (1993). PHYLIP, Version 3.5. Department of Genetic, University of Washington,
Seattle.
- Gebhardt, J.S. and Nierzwicki-Bauer, S.A. (1991) Identification of a common cyanobacterial
symbiont associated with *Azolla* spp. Through molecular and morphological
characterization of free-living and symbiotic cyanobacteria. App. Environ. Micro. 57:
2141-2146.
- Gevrek, M.N. (2000). A study on *Azolla* as a nitrogen source in rice farming. Turkish Journal of
Agriculture and Forestry 24: 165-172.
- Hossain, M.B., Mian, M.H., Hashem, M.A., Islam, M.Z. and Shamsuddoha, A.T.M. (2001). Use
of *Azolla* as biofertilizer for cultivation of BR 26 rice in aus season. Journal of Biological
Sciences. 1(12): 1120-1123.

- Kannaiyan, S. (1979). Utilization of *Azolla* for rice crop. Farmer and Parliament. 8: 33-37.
- Khan, M. M. 1987. Is *Azolla* & viable supplement and /or substitute for chemical fertilizers. SEARCA Technical Bulletin 3.
- Konar, R.N. and Kapoor, R.K. (1974). Embryology of *Azolla pinnata*. Phytomorphology. 22: 211.
- Liu Chung-chu. (1979). Use of *Azolla* in Rice Production in China. Nitrogen and Rice. 3: 375-394.
- Liu Xi-lian, Zhang Zhuang-ta, Ke Yu-si, Ling De-quan and Duan Bing-yuan. (1981). Utilization of *Azolla* in agricultural production in Kwangtong province. Kwangtong Agricultural Science. pp. 1-11.
- Lumpkin, T.A. and Plucknett, D.L. (1980). *Azolla*: botany, physiology and use as green manure. Economic Botany. 34(2): 111- 153.
- Lumpkin, T.A. and Plucknett, D.L. (1982). *Azolla* as a Green Manure: Use and Management in Crop Production. Boulder: West View Press.
- Lumpkin, T.A. and Bartholomew, D.W. (1986). Predictive models for the growth response of eight *Azolla* accessions to climatic variables. Crop Science. 26: 107-111.
- Martin, A.R.H. (1976). Some structures in *Azolla* megaspores and an anomalous form. Review of Paleobotany and Palynology. 12: 141.
- Maejima K., Uheda, E., Kitoh, S and Shiomi, N. (2002) Differences in growth rate, nitrogen fixation and numbers of cyanobionts and heterocysts among three *Azolla pinnata* var *pinnata* strains. Environ. Experiment. Bot. 47:143-147.
- Mitchell, D.S. (1974). The development of excessive populations of aquatic plants. In: Aquatic Vegetation and Its Use and Control. UNESCO. Paris. pp. 37-38.
- Mitchell, D.S. (1974). The development of excessive populations of aquatic plants. In: Aquatic Vegetation and Its Use and Control. UNESCO, Paris. pp. 37-38.
- Page, R.D.M. (1996). Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in Biosciences. 12:357-358.
- Rai, A. N., Soderback, E. and Bergman, B. 2000. Transley review no.116: Cyanobacterium-plant symbioses. Review New Phytology. 147: 449-481.
- Rai, A.K. and Rai, V. (2003) Effect of NaCl on growth, nitrate uptake and reduction and nitrogenase activity of *Azolla pinnata* - *Anabaena azollae*. Plant Science 164:61-69.

- Rai, V., Tiwari, S.P. and Rai, A.K. (2001) Effect of NaCl on nitrogen fixation of unadapted and NaCl-adapted *Azolla pinnata* – *Anabaena azollae*. *Aquatic Botany* 71: 109-117.
- Singh, P.K. (1979). Effect of *Azolla* on the yield of paddy with and without application on N fertilizer. *Current Science*. 46(18): 642-644.
- van Hove, C. (1989). *Azolla* and its multiple uses with emphasis on Africa. Rome. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. 53 pp.
- Walsby, A. E. and Nichols, B. W. (1969). Lipid composition of heterocysts. *Nature (London)*. 221: 673.
- Watanabe, I. (1978). *Azolla* and its use in lowland rice culture. *Tsuchi Bisebutsu*. 20: 1-10.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gene for phylogenetics. In *PCR protocol: a guide to methods and application*, M.A Innis, D. H. Gelfand and J.J. Sninsky. Academic Press, San Diego. pp. 315-322.
- Yanni, Y.G, Shalaan, S.N. and El-Haddad, M. (1994). Potential role of *Azolla* as green manure for rice in Nile Delta under different levels of inorganic fertilization. In: *Nitrogen Fixation with non-legumes* (eds.) N.A. Hegazi, M. Fayez and M. Monib. The American University in Cairo Press. pp 127-132.
- Zimmerman, WJ., Watanabe, I. and Lumpkin, TA. (1991). The *Anabaena-Azolla* symbiosis: Diversity and relatedness of neotropical host taxa. *Plant Soil*. 137: 167-170.

Curriculum vitae

Name: Chokchai Wanapu (ผศ. ดร. โชคชัย วนภู)
[ชื่อนามสกุลเดิม: อินทพฤษดิ์ (Intapruk)]

Sex: Male

Nationality: Thai

Religion: Buddhism

Date of Birth: September 15, 1959

Present Status: Assistant Professor in Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakonratchasima 30000, Thailand.

Education Background and Experience:

From 1978 - 1982: B.Sc. (Chemistry) from Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiangmai University, Chiangmai, Thailand.

From 1982 - 1984: M.Sc. (Biochemistry) from Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

From 1991 - 1994: Ph.D. (Engineering in Biotechnology) from Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Osaka University, Osaka, Japan.

From 1996 - 1997: Head of Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkla 90110, Thailand.

From 1997 - 1999: Director of Center of Scientific and Equipment, Walailak University, Nakonsritummarat 80000, Thailand.

From 1999 - 2001: Director of Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakonratchasima 30000, Thailand.

Scientific Experiences:

Plant and microbial molecular genetics.

Fermentation Techniques.

Alcohol Beverage Production.

Scientific Publication:

- Intapruk, C.,** Tirawanchai, N., Wilairat, P. and Panyim, S. (1984) Application of cloned malaria parasite DNA in strain identification. Mahidol University Annual Research Abstracts 11, 297.
- Intapruk, C.** (1984) in Manual for international laboratory workshop "Genetic engineering techniques in tropical diseases research" to be published by WHO special programme for research and training in tropical diseases, 195-204.
- Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.,** Tungpradubkul, S. and Panyim, S. (1984) Strain characterization of human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, by the use of a cloned parasite DNA probe. Microbial utilization of renewable resources. 4, 210-213.
- Tirawanchai, N., **Intapruk, C.,** Wilairat, P., Yuthavong, Y. and Panyim, S. (1985) Cloning of repetitive DNA from *Plasmodium falciparum* and its use in strain and species identification. Mahidol University Annual Research Abstracts, 12, 250.
- Intapruk, C.** (1985) in Manual for national laboratory workshop "DNA cloning techniques" (in Thai) to be published by the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, the Ministry of Science and Technology, 172-188.
- Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.,** Tungpradabkul, S., Sertsriwanich, R., Panyim, S., Yuthavong, Y. (1985) Recombinant DNA techniques as potential diagnostic means. Ann. Ist. Super. Sanita. 21, 299-305.
- Sriroongrueng, W. and **Intapruk, C.** (1989) The prenatal diagnosis of thalassemyias (in Thai). Songkla Med J. 6, 428-435.
- Intapruk C,** Higashimura N, Yamamoto K, Okada N, Shinmyo A and Takano M (1991) Nucleotide sequences of two genomic DNAs encoding peroxidase of *Arabidopsis thaliana*. Gene 98: 237-241.
- Intapruk C,** Yamamoto K, Fujiyama K, Shinmyo A and Takano M (1993) Cloning of cDNAs encoding two peroxidases of *Arabidopsis thaliana*. J Ferment Bioeng 75: 166-172.
- Shinmyo A, Fujiyama K, Kawaoka A and **Intapruk C** (1993) Structure and expression of peroxidase isozyme genes in horseradish and *Arabidopsis*. In: KG Welinder, SK Rasmussen, C Penel and H Greppin, eds, Plant Peroxidases Biochemistry and Physiology. Univ Geneva, Switzerland, pp 222-228.

- Intapruk C**, Yamamoto K, Sekine M, Shinmyo A and Takano M (1994) Regulatory sequences involved in the peroxidase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 13: 123-129.
- Intapruk C**, Takano M and Shinmyo A (1994) Nucleotide sequence of a new cDNA for peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 104: 285-286.
- Wanapu C** and Shinmyo A (1996) *cis*-Regulatory of the peroxidase gene in *Arabidopsis thaliana* involved in root specific expression and responsiveness to high-salt stress. *Ann New York Acad Sci.* 782 (12): 107-114.
- Rodtong, S.; **Wanapu, C.** and Ishizaki, A. (2000) Starch-utilizing bacteria for L-lactic acid production. The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. 52.
- Cheunkum, O. and **Wanapu, C.** (2002) Production of Lactic acid from cassava solid waste. The 3rd National Symposium on Graduate Research. 633-634.
- Sripo, T., Phongdara, A., **Wanapu, C.** and Caplan, A.B. (2002) Screening and characterization of aldehyde dehydrogenase gene from *Halomonas salina* strain AS11. *J. Biotech.* 95, 171-179.
- Kuapunyakoon, T. and **Wanapu, C.** (2003) Effects of diammonium phosphate (DAP) supplementation on growth rate and ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae* K1-V1116 in tamarind wine. *Suranaree J. Sci. Technol.* 10: 147-151.
- Sripunya, P., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N. (2004) Effect of β -glucosidase enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* strains on aroma production mango (Chok-anan) wine fermentation. *Thai J. Biotech.* (accepted).